



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

|  |  |  |
|--|--|--|
| <b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b><br><b>C12N 15/88, 15/10, A61K 9/51, C12N 15/11, 9/00, A61K 47/48</b>  | <b>A1</b>  | <b>(11) Numéro de publication internationale: WO 98/29557</b><br><b>(43) Date de publication internationale: 9 juillet 1998 (09.07.98)</b> |
| <b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR97/02332<br><b>(22) Date de dépôt international:</b> 17 décembre 1997 (17.12.97)<br><b>(30) Données relatives à la priorité:</b><br>96/16121 27 décembre 1996 (27.12.96) FR<br><b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> BIOVECTOR THERAPEUTICS (S.A.) [FR/FR]; Chemin du Chêne Vert, Boîte postale 169, F-31676 Labège Cedex (FR).<br><b>(72) Inventeurs; et</b><br><b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> BETBEDER, Didier [FR/FR]; 16, place de la Peupleraie, F-31140 Aucamville (FR). KRAVTZOFF, Roger [FR/FR]; Lieu Dit "Damiac", F-31450 Fourquevaux (FR). DE MIGUEL, Ignacio [FR/FR]; 5, rue Pasteur, F-31830 Plaisance du Touch (FR). SIXOU, Sophie [FR/FR]; 2, rue des Novars, F-31300 Toulouse (FR). PAVCO, Pamela [US/US]; 705 Barberry Circle, Lafayette, CO 80026 (US). JARVIS, Thale [US/US]; 3720 Smuggler Place, Boulder, CO 80303 (US).<br><b>(74) Mandataire:</b> BREESE-MAJEROWICZ; 3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).  | <b>(81) Etats désignés:</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).<br><br><b>Publiée</b><br><i>Avec rapport de recherche internationale.</i> |  |
| <b>(54) Title:</b> CONJUGATES OF A PARTICLE VECTOR AND OLIGONUCLEOTIDES, PROCESS FOR THEIR PREPARATION, AND PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS CONTAINING THEM<br><b>(54) Titre:</b> CONJUGUES D'UN VECTEUR PARTICULAIRE ET D'OLIGONUCLEOTIDES, LEUR PROCEDE DE PREPARATION ET LES COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LES CONTENANT<br><b>(57) Abstract</b><br><p>The invention relates to an ionic conjugate, which is stable in a biological medium, and which is comprised of a particle vector with at least one cationic, nonliquid, hydrophilic nucleus and of polyanionic oligonucleotides. The invention further concerns the pharmaceutical compositions containing these conjugates and the use of a particle vector to carry the oligonucleotides to the cells.</p> <b>(57) Abrégé</b><br><p>L'invention concerne un conjugué ionique, stable dans un milieu biologique, d'un vecteur particulaire comprenant au moins un noyau hydrophile non liquide cationique et d'oligonucléotides polyanioniques. L'invention concerne aussi les compositions pharmaceutiques contenant ces conjugués et l'utilisation de vecteur particulaire pour délivrer des oligonucléotides dans les cellules.</p> |  |  |

### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

|    |                           |    |   |    |  |    |                       |
|----|---------------------------|----|---|----|--|----|-----------------------|
| AL | Albanie                   | ES | Espagne                                       | LS | Lesotho                                  | SI | Slovénie              |
| AM | Arménie                   | FI | Finlande                                      | LT | Lituanie                                 | SK | Slovaquie             |
| AT | Autriche                  | FR | France  | LU | Luxembourg                               | SN | Sénégal               |
| AU | Australie                 | GA | Gabon   | LV | Lettonie                                 | SZ | Swaziland             |
| AZ | Azerbaïdjan               | GB | Royaume-Uni                                   | MC | Monaco                                   | TD | Tchad                 |
| BA | Bosnie-Herzégovine        | GE | Géorgie                                       | MD | République de Moldova                    | TG | Togo                  |
| BB | Barbade                   | GH | Ghana   | MG | Madagascar                               | TJ | Tadjikistan           |
| BE | Belgique                  | GN | Guinée  | MK | Ex-République yougoslave<br>de Macédoine | TM | Turkménistan          |
| BF | Burkina Faso              | GR | Grèce   | ML | Mali                                     | TR | Turquie               |
| BG | Bulgarie                  | HU | Hongrie                                       | MN | Mongolie                                 | TT | Trinité-et-Tobago     |
| BJ | Bénin                     | IE | Irlande                                       | MR | Mauritanie                               | UA | Ukraine               |
| BR | Brésil                    | IL | Israël  | MW | Malawi                                   | UG | Ouganda               |
| BY | Bélarus                   | IS | Islande                                       | MX | Mexique                                  | US | Etats-Unis d'Amérique |
| CA | Canada                    | IT | Italie  | NE | Niger                                    | UZ | Ouzbékistan           |
| CF | République centrafricaine | JP | Japon   | NL | Pays-Bas                                 | VN | Viet Nam              |
| CG | Congo                     | KE | Kenya   | NO | Norvège                                  | YU | Yougoslavie           |
| CH | Suisse                    | KG | Kirghizistan                                  | NZ | Nouvelle-Zélande                         | ZW | Zimbabwe              |
| CI | Côte d'Ivoire             | KP | République populaire<br>démocratique de Corée | PL | Pologne                                  |    |                       |
| CM | Cameroun                  | KR | République de Corée                           | PT | Portugal                                 |    |                       |
| CN | Chine                     | KZ | Kazakhstan                                    | RO | Roumanie                                 |    |                       |
| CU | Cuba                      | LC | Sainte-Lucie                                  | RU | Fédération de Russie                     |    |                       |
| CZ | République tchèque        | LI | Liechtenstein                                 | SD | Soudan                                   |    |                       |
| DE | Allemagne                 | LK | Sri Lanka                                     | SE | Suède                                    |    |                       |
| DK | Danemark                  | LR | Libéria                                       | SG | Singapour                                |    |                       |
| EE | Estonie                   |    |   |    |  |    |                       |

CONJUGUÉS D'UN VECTEUR PARTICULAIRE ET  
D'OLIGONUCLÉOTIDES, LEUR PROCÉDÉ DE PRÉPARATION ET LES  
COMPOSITIONS PHARMACEUTIQUES LES CONTENANT.

5 L'invention se rapporte à des conjugués permettant l'adressage d'oligonucléotides, antisens et de ribozymes, dans les cellules, leur procédé de préparation et les compositions pharmaceutiques les contenant.

10 Les oligonucléotides constituent une classe de molécules particulièrement intéressante du fait de leur aptitude à former par hybridation des complexes spécifiques avec des séquences d'acides nucléiques complémentaires. Ces complexes peuvent se présenter sous  
15 la forme de duplexes résultant de l'hybridation d'oligonucléotides avec des séquences d'ADN simples brins ou avec des séquences d'ARN, comme de l'ARNm, ou encore sous forme de triplexes, par hybridation avec des molécules d'ADN doubles brins (1-6).

20 Les propriétés rappelées ci-dessous confèrent aux oligonucléotides des possibilités d'applications remarquables pour l'étude des gènes et dans le domaine thérapeutique (17). Ainsi, l'invention se rapporte plus particulièrement aux oligonucléotides  
25 antisens et aux ribozymes, dont on a déjà étudié la capacité à inhiber spécifiquement l'expression de gènes sur des modèles *in vitro* (16, 18) et la prolifération des cellules *in vivo* (19, 20), ainsi que l'activité RNase H des ribozymes.

30 La fixation d'oligonucléotides et des ribozymes sur les ARNm conduit à l'inhibition de la traduction dudit ARNm selon deux processus généraux, d'une part la dégradation de cet ARNm ou des duplexes ARN/ADN par la ribonucléase H cellulaire (RNase H) ou  
35 par l'activité catalytique des ribozymes, d'autre part le blocage stérique de la machinerie cellulaire (1-9).

L'utilisation d'oligonucléotides chimiquement modifiés permet d'améliorer leur incorporation par la cellule et leur résistance aux nucléases (10), notamment les 3'-exonucléases. Parmi, les modifications chimiques d'oligonucléotides proposées dans l'art antérieur, la plus prometteuse semble être l'utilisation d'analogues structuraux des oligonucléotides phosphodiesters comme les oligonucléotides phosphorothioates. Ceux-ci résistent au clivage par les nucléases et n'inhibent pas la dégradation par la RNase H (28). Ces avantages ont conduit à plusieurs études cellulaires et de pharmacocinétique (18, 29, 30) ainsi qu'à des essais cliniques de ces composés comme agents antitumoraux et antiviraux (31). Mais, la mise en évidence d'effets non-spécifiques a limité considérablement l'enthousiasme de l'utilisation thérapeutique des oligonucléotides antisens (17, 32, 33).

En outre, une contrainte majeure de l'utilisation de ces oligonucléotides modifiés réside dans le fait que les complexes d'hybridation entre l'ARN et l'oligonucléotide doivent être suffisamment stables pour ne pas être dissociés par la machinerie cellulaire. Ainsi, lorsque les oligonucléotides antisens ou les ribozymes sont dirigés vers la région codante, ils sont séparés de leur cible par les ribosomes de la traduction (11-15). Cette dissociation peut être évitée en associant aux oligonucléotides des réactifs capables de réagir spontanément, ou après irradiation, avec l'ARN cible (3-6, 10, 11).

On connaît par exemple la Demande de Brevet Internationale publiée sous le n° WO 90/12020 qui propose de coupler la furocoumarine à un oligonucléotide par l'intermédiaire d'un sucre ribose ou déoxyribose. Les Demandes de Brevet Européen n° 316 016, Internationale n° WO 89/06702 et Allemand

n° 3928900 décrivent l'utilisation de conjugués de psoralène et d'oligonucléotides pour bloquer l'expression génétique. La demande de Brevet Français n° 2 568 254, décrit l'application de composés oligonucléotides liés à un agent intercalant pour le blocage sélectif d'une séquence d'acide nucléique, et plus particulièrement l'application de ces composés au blocage sélectif *in vivo* de l'expression d'un gène ou d'une séquence impliquée dans l'initiation, la propagation ou la terminaison de la réplication d'un acide nucléique, de la transcription d'un ou plusieurs gènes et/ou de leur traduction.

Toutefois, ces méthodes chimiques présentent des inconvénients, car, l'induction de pontages par des agents chimiques s'accompagne souvent de réactions non spécifiques, et l'activation photochimique est difficile à mettre en oeuvre *in vivo*.

L'efficacité des oligonucléotides antisens et de ribozymes est également limitée, d'une part du fait de leur nature polyanionique qui conduit à des interactions non-spécifiques avec des molécules extracellulaires cationiques (21, 22), et d'autre part, en raison de leur faible diffusion au travers de la membrane plasmique (23-25). Afin de palier ces inconvénients, il est proposé dans l'art antérieur d'utiliser, comme indiqué précédemment, des oligonucléotides chimiquement modifiés ou des systèmes de transport et de délivrance (27).

Les stratégies d'encapsulation des oligonucléotides et de ribozymes semblent constituer une meilleure approche que les modifications chimiques pour favoriser à la fois le transport et la stabilité d'oligonucléotides non-modifiés, tout en conservant leur spécificité d'hybridation. Ainsi, il a été réalisé, dans l'art antérieur, l'encapsulation d'oligonucléotides dans des liposomes, dans des immunoliposomes (34, 35) ou des

liposomes sensibles au pH (36). Il a été montré que l'encapsulation permet une protection relative des oligonucléotides contre les nucléases et augmente leur délivrance dans des cellules. Malgré ces avantages, l'encapsulation d'oligonucléotides dans des liposomes n'est pas entièrement satisfaisante notamment en raison de problèmes dans le rendement d'encapsulation. Il a également été envisagé, dans l'art antérieur, que l'interaction entre des oligonucléotides conjugués au cholestérol avec des LDL naturels, permet de prolonger la demi-vie plasmatique des oligonucléotides (38), de 1 à 10 minutes, et d'augmenter l'efficacité *in vitro* d'oligonucléotides antisens (39). Toutefois, la préparation de LDL à partir de plasma humain et la faible stabilité des oligonucléotides ainsi associés demeurent des handicaps majeurs à leur utilisation thérapeutique.

Des lipides cationiques, comme le DOTMA ou le DOTAP, déjà connus pour la transfection d'ADN, pourraient également constituer des transporteurs d'oligonucléotides (40, 41) et de ribozymes. Leur efficacité a été démontrée, et plus particulièrement les complexes oligonucléotides et DOTAP permettent une augmentation du transport et une diminution de la dégradation intra et extra cellulaire des oligonucléotides (41). Mais la toxicité cellulaire de ces complexes limite leur utilisation dans des expériences *in vitro* (27, 42) ou pour une administration locale (43).

Plus récemment, l'adsorption d'oligonucléotides sur des nanoparticules de polyalkylcyanoacrylate a permis de renforcer la protection contre la dégradation par les nucléases (44). L'inhibition de la croissance néoplasique chez des souris nues a été observée avec une concentration d'oligonucléotides adsorbés sur ces nanoparticules,

100 fois plus faible qu'avec des oligonucléotides libres (45). Mais les possibilités d'utilisation systémique de ces véhicules n'ont pas été démontrées à ce jour.

5 Il n'existe donc à ce jour aucun système de transport, d'adressage et de protection efficace des oligonucléotides, antisens et ribozymes, permettant leur utilisation thérapeutique.

10 La Demanderesse a développé son expertise dans la préparation de vecteurs particuliers synthétiques, désignés sous le terme général de Biovecteurs Supramoléculaires (BVSM) ou Biovecteurs, capables de fixer, et avantageusement de vectoriser, 15 différentes substances ou principes actifs, et donc utiles pour la fabrication de compositions pharmaceutiques.

Un premier type de Biovecteurs Supramoléculaires, et son procédé de préparation, a été décrit dans le brevet européen No. 344 040.

20 Il s'agit de particules comprenant de l'intérieur vers l'extérieur :

- un noyau central hydrophile non liquide constitué d'une matrice de polysaccharides ou d'oligosaccharides naturellement ou chimiquement 25 réticulés, pouvant être modifiés par des groupements ioniques divers;

- une couche d'acides gras greffés par des liaisons covalentes au noyau;

30 - une ou plusieurs couches lipidiques constituées notamment de phospholipides.

Les développements de cette première génération de Biovecteurs Supramoléculaires ont conduit la Demanderesse à concevoir et préparer de nouveaux Biovecteurs Supramoléculaires, aux propriétés améliorées 35 notamment en fonction des principes actifs transportés. Les demandes de brevet internationales PCT publiées sous

les No. WO 92/21329, WO 92/21330, WO 94/23701, WO 94/20078 et WO 96 06 638 décrivent ces Biovecteurs Supramoléculaires, leur fabrication, leur association à divers principes actifs et leur utilisation pour la  
5 préparation de compositions pharmaceutiques.

L'enseignement des demandes de brevets ci-dessus est incorporé dans la présente description par référence.

L'association d'un Biovecteur  
10 Supramoléculaire avec des oligonucléotides a été envisagée dans la demande de brevet internationale PCT No. WO 92/21330, dans le cadre d'un Biovecteur Supramoléculaire possédant un tropisme sélectif pour un type de cellule, et présentant donc la structure  
15 particulière suivante :

- un noyau hydrophile non liquide,
- une première couche de nature lipidique  
liée au noyau par des liaisons covalentes,
- une seconde couche de phospholipides liée  
20 à la première couche par des interactions hydrophobes,
- des molécules d'apolipoprotéine B greffées  
sur la couche de phospholipides ou de ligands protéiques  
ou peptidiques capables de reconnaître spécifiquement  
les récepteurs cellulaires des LDL.

25 La possibilité de l'association d'un Biovecteur Supramoléculaire avec des oligonucléotides a également été présentée par les Inventeurs lors du "21st International Symposium on Controlled release of  
30 Bioactive Materials", qui s'est tenu du 27 au 30 Juin 1994 à Nice (France). Lors de cette présentation, il a été proposé d'utiliser des Biovecteurs Supramoléculaires pour  
augmenter l'efficacité thérapeutique d'oligonucléotides non modifiés. Les Biovecteurs  
35 Supramoléculaires envisagés étaient du type décrit dans la demande de brevet internationale PCT WO 92 21 329



c'est à dire constitués d'un noyau de polysaccharides réticulés par l'épichlorhydrine, fonctionnalisés par du chlorure de glycidyltriméthylammonium afin de faire apparaître des charges positives, et recouvert d'une première couche d'acides gras et d'une seconde couche lipidique. Il était proposé d'associer les noyaux acylés aux oligonucléotides par simple mélange en milieu aqueux, puis de réaliser la couche externe lipidique par mélange des noyaux acétylés associés aux oligonucléotides avec une solution de lipide.

Les travaux de recherche menés par la Demanderesse depuis ce symposium, lui ont permis de mettre en évidence, comme indiqué dans les exemples rapportés ci-après, que l'efficacité d'une association d'un Biovecteur Supramoléculaire et d'oligonucléotides ne relevait pas d'une simple incorporation des oligonucléotides dans le Biovecteur Supramoléculaire, mais nécessite la formation d'un conjugué ionique qui doit être stable dans un milieu biologique présentant les caractéristiques ioniques du plasma sanguin, et permettre le transport, la protection et l'adressage d'oligonucléotides, antisens ou ou ribozymes, dans les cellules et avantageusement dans leur cytoplasme. En outre, il s'agit de préparer des conjugués dont le taux d'association d'oligonucléotides est maximal afin d'assurer l'efficacité optimale de l'effet désiré.

Or, un tel conjugué ionique stable établi entre, d'une part les charges positives du noyau et, d'autre part, des oligonucléotides polyanioniques, ne peut être obtenu que si le taux de réticulation de la matrice et le niveau de charges positives du noyau sont rigoureusement définis.

Les travaux ayant conduit à la présente invention ont été réalisés grâce aux connaissances de la Demanderesse sur les procédés de fabrication des

Biovecteurs Supramoléculaires, qui lui ont permis d'étudier les possibilités de modulation du degré de réticulation de la matrice polysaccharidique et d'ajustements du niveau de charges cationiques du noyau.

5 L'invention a donc pour but de fournir de nouveaux moyens de transport, de protection et d'adressage d'oligonucléotides dans les cellules, notamment à des fins thérapeutiques. Ce but est atteint grâce à un nouveau conjugué ionique, stable dans un milieu biologique, d'un vecteur particulaire comportant  
10 au moins un noyau hydrophile non liquide cationique et d'oligonucléotides polyanioniques, permettant de transporter dans les cellules et de protéger lesdits oligonucléotides capables de s'hybrider avec un ARNm  
15 cellulaire.

L'invention se rapporte plus particulièrement à un conjugué d'un vecteur particulaire et d'oligonucléotides, caractérisé en ce que le vecteur  
20 particulaire comprend au moins un noyau hydrophile non liquide constitué d'une matrice de polysaccharides ou d'oligosaccharides naturellement ou chimiquement réticulés et modifiés par des ligands cationiques, dont le taux de charges positives est compris entre environ  
25 0,6 et 1,8 milliEquivalent de charges positives par gramme de noyau et le taux de réticulation est sensiblement celui obtenu par réticulation avec entre 5 et 20% de mole d'épichlorhydrine par mole d'ose dans les polysaccharides ou oligosaccharides, et en ce que ledit  
30 vecteur particulaire est conjugué par des liaisons ioniques stables en milieu biologique à des oligonucléotides polyanioniques protégés par ledit vecteur particulaire, lesdits oligonucléotides étant capables de s'hybrider à un ARNm cellulaire.

35

Les résultats rapportés dans les exemples ci-après montrent les propriétés remarquables des conjugués selon l'invention. Plus particulièrement, il a été observé que :

5                   - la quantité d'oligonucléotides conjuguée au vecteur particulaire est au moins égale et souvent très supérieure à celle possible avec les systèmes de simple transport de l'art antérieur; en effet, de l'ordre de 1000 copies d'un oligonucléotide peuvent être  
10 conjuguées au vecteur particulaire;

                  - la demi-vie d'oligonucléotides dans le conjugué de l'invention est augmentée d'environ 8 fois par rapport à celle d'oligonucléotides libres;

15                   - l'internalisation des conjugués de l'invention dans les cellules permet d'augmenter d'environ 30 fois la quantité d'oligonucléotides passant la membrane cellulaire en 5 heures, et d'environ 10 fois la quantité d'oligonucléotides dans le cytosol desdites cellules.

20                   Les travaux réalisés par la Demanderesse sur les vecteurs particuliers et la préparation du conjugué de l'invention, ont permis d'obtenir, de manière surprenante par rapport aux spéculations de l'art antérieur, des taux et des rendements d'association  
25 optimaux, puisque la Demanderesse est parvenue, dans des conditions optimales, à conjuguer 100% des oligonucléotides mélangés aux vecteurs particuliers. Ces conditions optimales sont de l'ordre de 0 à 0,3 g d'oligonucléotides par gramme de vecteurs.

30                   Le vecteur particulaire du conjugué de l'invention comporte au moins un noyau hydrophile non liquide, dont la taille est généralement comprise entre 10 nm et 5 µm et qui est constitué, de préférence, d'une  
35 matrice de polysaccharides ou d'oligosaccharides

naturellement ou chimiquement réticulé portant une charge globale cationique.

Les polysaccharides de la matrice sont choisis dans le groupe comprenant le dextrane, l'amidon, la cellulose, leurs dérivés et substitués, leurs produits d'hydrolyse et leurs sels et esters.

Une caractéristique essentielle du noyau, adaptée à la formation de conjugués avec des oligonucléotides, réside dans le taux de réticulation de la matrice. Ce taux de réticulation est défini par référence à la capacité de réticulation d'une quantité définie d'épichlorhydrine, qui est un agent de réticulation bien connu et décrit dans les demandes de brevet de la Demanderesse citées précédemment. Le taux de réticulation de la matrice permettant la réalisation des conjugués de l'invention est obtenu par réaction avec entre 5 et 20% de mole d'épichlorhydrine par mole d'ose dans les polysaccharides ou oligosaccharides constituant la matrice du noyau.

Ce niveau de réticulation est déterminant pour assurer la stabilité du conjugué de l'invention dans les liquides biologiques du type du plasma sanguin. Or, sans cette stabilité, l'efficacité *in vivo* et *in vitro* des conjugués de l'invention pour transporter et adresser les oligonucléotides dans les cellules cibles serait considérablement diminuée.

Une autre caractéristique essentielle de la matrice hydrophile du noyau est d'être ionisée positivement. Cette ionisation cationique est obtenue par greffage, sur la matrice hydrophile, de ligands portant des fonctions chargées positivement.

Le taux de charges positives du noyau constitue, comme le taux de réticulation de la matrice hydrophile, une caractéristique essentielle du conjugué dont dépend son efficacité. Le caractère cationique du noyau est en effet indispensable à la formation du

conjugué ionique de l'invention avec des oligonucléotides polyanioniques. Mais ce caractère cationique doit être rigoureusement défini de façon à assurer la fonctionnalité du conjugué dans une stratégie thérapeutique. Ainsi, les travaux de recherche menés par la Demanderesse ont établi que le noyau doit posséder entre 0,6 à 1,8 milliEquivalent et de préférence de 0,8 à 1,6 milliEquivalent de charges positives par gramme de noyau pour assurer un niveau de conjugaison efficace avec les oligonucléotides.

Les taux de réticulation et de charges positives du noyau définis ci-dessus sont déterminants pour obtenir la conjugaison maximale entre le vecteur et les oligonucléotides, et assurer la stabilité et la faible toxicité des conjugués de l'invention.

Selon une forme de réalisation particulière de l'invention, le noyau hydrophile non liquide est recouvert en totalité ou en partie d'au moins une couche de composés amphiphiles. Avantageusement ces composés amphiphiles sont choisis parmi les lipides et phospholipides naturels ou synthétiques, les céramides, les acides gras, les glycolipides, les lipoprotéines et les tensioactifs. L'invention envisage plus particulièrement, des vecteurs particuliers dont le noyau hydrophile non liquide est recouvert en totalité ou en partie d'une couche externe constituée :

- essentiellement de phospholipides naturels ou synthétiques et/ou de céramides, éventuellement associés à d'autres composés amphiphiles, ou

- d'acides gras naturels fixés au noyau par des liaisons covalentes.

Une autre forme de réalisation d'un conjugué de l'invention consiste à utiliser des Biovecteurs du type décrit dans le brevet européen No. 344 040, c'est à dire comportant un noyau central précédemment défini, recouvert en totalité ou en partie de deux couches de

composés amphiphiles. Les composés amphiphiles sont ceux décrits précédemment. Dans cette forme de réalisation, on préfère plus particulièrement le cas d'un noyau central recouvert en totalité ou en partie d'une première couche d'acides gras, elle-même recouverte en totalité ou en partie d'une couche lipidique.

La mise en oeuvre de vecteurs particuliers comportant au moins une couche amphiphile permet avantageusement d'associer au conjugué de l'invention un principe actif supplémentaire utile pour le transport, l'adressage ou la présentation du conjugué au niveau de la membrane de la cellule, dans le cytoplasme ou lors de l'hybridation avec un ARNm cible. Mais l'association d'un principe actif supplémentaire peut être également réalisée au niveau du noyau du vecteur particulier du conjugué.

Les oligonucléotides conjugués au vecteur particulier de l'invention sont des oligodésoxyribonucléotides ou oligoribonucléotides naturels ou modifiés, éventuellement marqués, comportant de l'ordre de 5 bases jusqu'à une centaine de bases. De tels marquage(s) et/ou modification(s) sont acceptable dans le cadre de l'invention, s'ils ne changent pas substantiellement le caractère polyanionique de l'oligonucléotide. Les oligonucléotides conjugués au vecteur particulier de l'invention couvrent également les antisens et les ribozymes. Le vecteur particulier selon l'invention peut être conjugué à plusieurs dizaines jusqu'à de l'ordre de 1000 copies d'un même oligonucléotide, ou être conjugué à plusieurs oligonucléotides de séquences différentes, et dans ce cas, chaque oligonucléotide de séquence différente doit être présent à environ de l'ordre de 100 copies.

L'invention se rapporte aussi à des compositions pharmaceutiques comprenant un ou plusieurs conjugués selon l'invention ou leurs sels pharmaceutiquement acceptables, dispersés dans des excipients pharmaceutiquement acceptables. Ces compositions pharmaceutiques peuvent être par exemple administrées par voie systémique ou encore être appliquées localement, les excipients ou véhicules utilisés sont choisis pour être compatibles avec le mode d'administration ou d'application retenu.

L'invention concerne également le conjugué défini précédemment destiné à être utilisé pour adresser un oligonucléotide dans une cellule et notamment dans le cytoplasme.

L'invention a en outre pour objet les vecteurs particuliers mis en oeuvre dans les conjugués décrits précédemment. Ces vecteurs particuliers sont du type comprenant au moins un noyau hydrophile non liquide cationique constitué d'une matrice de polysaccharides ou d'oligosaccharides naturellement ou chimiquement réticulés portant une charge globale cationique et présentant au moins une des caractéristiques suivantes :

- le taux de réticulation est sensiblement celui obtenu par réticulation avec entre 5 et 20% de mole d'épichlorhydrine par mole d'ose dans les polysaccharides ou oligosaccharides;

- ladite matrice de polysaccharides ou d'oligosaccharides naturellement ou chimiquement réticulés est modifiée par des ligands cationiques, dont le taux de charges positives est compris entre 0,6 et 1,8 milliEquivalents et avantageusement entre 0,8 et 1,6 milliEquivalent de charges positives par gramme de noyau.

Selon une forme de réalisation particulière du vecteur particulaire de l'invention, le noyau hydrophile non liquide est recouvert en totalité ou en partie d'au moins une couche de composés amphiphiles. 5  
Avantageusement ces composés amphiphiles sont choisis parmi les lipides et phospholipides naturels ou synthétiques, les céramides, les acides gras, les glycolipides, les lipoprotéines et les tensioactifs. L'invention envisage plus particulièrement, des vecteurs 10  
particulaires dont le noyau hydrophile non liquide est recouvert en totalité ou en partie d'une couche externe constituée :

- essentiellement de phospholipides naturels ou synthétiques et/ou de céramides, éventuellement 15  
associés à d'autres composés amphiphiles, ou
- d'acides gras naturels fixés au noyau par des liaisons covalentes.

Les résultats rapportés dans les exemples 20  
ci-après, montre qu'un vecteur particulaire comprenant au moins un noyau hydrophile non liquide cationique, est avantageusement utilisable pour adresser des oligonucléotides au cytoplasme d'une cellule.

Comme indiqué précédemment, les 25  
oligonucléotides adressées dans le cytoplasme d'une cellule sont des oligoribonucléotides ou oligodésoxyribonucléotides, antisens ou ribozymes, éventuellement marqués, naturels ou modifiés dès lors que le marquage ou la modification ne change pas 30  
substantiellement le caractère polyanionique des oligonucléotides.

L'invention concerne également les procédés 35  
de préparation des conjugués ioniques définis précédemment. En effet, les procédés décrits dans l'art antérieur ne permettent pas d'obtenir des conjugués



présentant toutes les propriétés requises pour une stratégie antisens ou ribozyme. Les travaux de recherche réalisés par la Demanderesse sur la préparation de conjugués lui ont permis de définir des procédés permettant d'obtenir de façon reproductible des conjugués fonctionnels.

Un tel procédé est caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) la préparation du noyau cationique :  
- en mélangeant un polymère hydrophile, de nature polysaccharidique ou oligosaccharidique, chimiquement ou naturellement réticulé avec un agent de réticulation dans un rapport compris entre 0,06 et 0,2 mole, et de préférence entre 0,1 et 0,15 mole, d'agent de réticulation par unité d'ose dans le polysaccharide ou l'oligosaccharide,

- en ajoutant au mélange ci-dessus un ligand cationique de façon à obtenir un taux de charge du noyau compris entre 0,6 et 1,8 et de préférence entre 0,8 et 1,6 millEquivalent par gramme de noyau;

b) le chargement des oligonucléotides polyanioniques :

- en ajoutant, sous agitation, au noyau préparé à l'étape (a), entre environ 0,02 et 0,4 gramme, et de préférence entre 0,05 et 0,2 gramme, d'oligonucléotide par gramme de noyau, selon un débit compris entre environ 0,25 µg d'oligonucléotide par mg de noyau et par heure et 6mg par mg de noyau et par heure, et de préférence entre 4 µg/mg/heure et 1 mg/mg/heure, à une température comprise entre environ 20°C et 60°C et de préférence entre 40°C et 50°C.

Selon le type de vecteur particulière entrant dans la composition du conjugué de l'invention, le procédé ci-dessus peut comprendre des aménagements à l'étape (a).

Pour la préparation de vecteur particulaire dont le noyau est recouvert en totalité ou en partie d'une ou deux couches de composés amphiphiles, l'étape (a) comprend en outre, le greffage sur le noyau ou la couche sous-jacente d'une couche constituée de composés amphiphiles.

Il peut s'agir du greffage :

- d'une couche d'acides gras, liée au noyau par des liaisons covalentes, et/ou

- d'un feuillet externe capable de modifier le comportement cellulaire du conjugué de l'invention, constitué, par exemple de phospholipides zwitterioniques associés ou non à des lipides anioniques et/ou cationiques, lié à la couche sous-jacente ou au noyau par des liaisons hydrophobes et/ou ioniques et/ou hydrogènes.

Une forme de mise en oeuvre préférée de l'étape (b) du procédé de l'invention consiste à ajouter à des vecteurs particuliers préparés conformément à l'étape (a), dont la concentration exprimée en noyau cationique est comprise entre 1 et 20 mg/ml, une solution d'oligonucléotides à une concentration comprise entre 1 et 20 mg/ml, de façon à obtenir un rapport oligonucléotides/vecteurs particuliers compris entre 2 et 40%, et de préférence entre 5 et 20%, selon une cinétique d'ajout de la solution d'oligonucléotides comprise entre 5 µl/ml/h et 300 µl/ml/h, et à une température d'incubation comprise entre 20°C et 60°C, et préférentiellement entre 40°C et 50°C,

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaissent des exemples qui suivent qui concernent la préparation et l'utilisation des vecteurs particuliers et des conjugués de l'invention et qui se réfèrent aux dessins en annexe dans lesquels :

- La figure 1 représente l'effet de la densité de charge sur la cytotoxicité des NPS cationiques. Des NPS cationiques possédant différentes densités de charges sont incubés avec des cellules HL60. Après 72 heures d'incubation la viabilité cellulaire est déterminée par un test au MTT.

- La figure 2 représente l'effet du taux de réticulation (rapport épichlorhydrine/unités ose) sur la cytotoxicité des NPS cationiques. Des NPS cationiques (1,4 mEq/g) possédant différents taux de réticulation sont incubés avec des cellules HL60. Après 72 heures d'incubation la viabilité cellulaire est déterminée par un test au MTT.

- La figure 3 représente l'effet de la réticulation sur les caractéristiques des conjugués Antisens Biovecteur. Des NPS cationiques (1,4 mEq/g) possédant différents taux de réticulation sont conjugués à des Antisens. Après conjugaison les rendements d'association (■) et la stabilité en PBS (phosphate Buffered Saline) (▲) sont déterminés en fonction du taux de réticulation de NPS.

- La figure 4 représente les cinétiques de dégradation des oligonucléotides dans différents milieux. Des oligonucléotides libres (symboles vides) ou conjugués au biovecteurs (symboles pleins) sont incubés dans du milieu de culture complémenté en sérum (■;□), milieu de culture complémenté en sérum inactivé (▲;△) et en plasma humain (●;○). Après incubation, les échantillons sont analysés par électrophorèse (20% PAGE) et autoradiographie. La quantité d'oligonucléotides non dégradés est exprimée en pourcentage du témoin (T0).

- La figure 5 représente la cinétique de pénétration des oligonucléotides dans les cellules. Des cellules MCF7 sont incubées avec des oligonucléotides

libres ( ■;□ ) ou conjugués aux biovecteurs ( ▲;△ ).  
Deux concentrations différentes d'oligonucléotide sont  
utilisées, 0,8 µg/ml ( □;▲ ) et 6,2 µg/ml ( ■;□ ).  
Après différents temps d'incubation, la pénétration  
cellulaire des oligonucléotides étaient déterminée par  
cytométrie en flux.

- La figure 6 représente l'activité  
cellulaire des conjugués Antisens biovecteurs. Des  
oligonucléotides Antisens ciblant l'oncogène c-myc (15  
mers phosphorothioate) sont conjugués à des biovecteurs.  
Ces oligonucléotides libres ou conjugués aux biovecteurs  
ainsi que les biovecteurs libres sont incubés avec  
5 x 10<sup>4</sup> cellules HL60. A différents temps d'incubation,  
la prolifération cellulaire est déterminée par un test  
MTT. Les résultats sont exprimés en Densité Optique à  
570 nm.

- La figure 7 représente l'activité  
cellulaire des conjugués Ribozymes/Biovecteurs. Des  
oligonucléotides Ribozymes ciblant l'oncogène c-myc (35  
mers) sont conjugués à des biovecteurs ou à de la  
Lipofectamine. Ces Ribozymes libres ou conjugués (figure  
7a), ainsi que différents contrôles, conjugués  
Biovecteurs Ribozyme inactif, conjugués Biovecteurs  
Scrambled Ribozyme, conjugué Ribozyme inactif  
lipofectamine et biovecteur libre (figure 7b), sont  
incubés avec 2 x 10<sup>5</sup> cellules. Les résultats sont  
exprimés en pourcentage de prolifération cellulaire par  
rapport au contrôle (cellules non traitées)

- La figure 8 représente l'inhibition  
spécifique de la synthèse d'une protéine par un antisens  
phosphorothioate (ODM-PO) ou phosphodiester (ODM-PD)  
conjugué aux biovecteurs. L'inhibition de la production  
de P185-erb2 est mesurée après incubation de cellules  
SK-Br3 avec différentes préparations d'oligonucléotides.  
Les résultats sont exprimés en pourcentage d'inhibition

par rapport au contrôle (cellules non traitées). Dans cette figure les abréviations des différentes préparations d'oligonucléotides ont les significations suivantes : SMBV = Biovecteur vide ; SMBV-AS = Conjugué Biovecteur antisens ; SMBV-SC = Conjugué Biovecteur "scramble" ; DOTAP = DOTAP seul ; DOTAP-AS = Conjugué antisens Biovecteur ; DOTAP-SC = Conjugué DOTAP "scramble" ; Control = Cellules seules ; Control-AS = Antisens libres ; Control-SC = "Scramble" libre.

- La figure 9 représente l'inhibition de la prolifération d'une lignée SK-Br3 par des conjugués biovecteurs Antisens anti erb2. La prolifération de cellules SK-Br3 est déterminée après incubation des cellules avec un antisens anti erb2 conjugué des biovecteurs. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules en fonction du temps. Le contrôle correspond à des cellules traitées en absence d'oligonucléotide et de biovecteur.

Exemple 1 : Préparation de Nouveaux Polysaccharidiques Cationiques possédant différents taux de charge.

Dans un réacteur de 3 litres, on solubilise 100g de Glucidex 2 (Roquette, France) dans 0.2 litres de NaOH 2N. Lorsque la solution est homogène, on introduit l'agent de réticulation, epichlorhydrine (Fluka, Suisse), avec un rapport molaire (mole d'epichlorhydrine/mole d'unité glucose) de 10%. Après la fin de l'addition, la préparation est maintenue sous agitation pendant 12 heures à 20°C. On ajoute ensuite le Glycidyl Triméthylammonium Chloride (GTMA, Fluka, Suisse). De façon à obtenir différents taux de charge, plusieurs rapports molaires GTMA/ unité glucose sont utilisés (Table 1). Lorsque tout le GTMA est ajouté, on laisse la préparation sous agitation pendant 8 heures à 20°C. Le gel ionique obtenu est ensuite dispersé dans 2

litres d'eau osmosée, neutralisé avec de l'acide acétique et homogénéisé par un homogénéisateur Rannie (type Minilab 8:30) à une pression de 1000 bars.

5 Les Noyaux Polysaccharidiques (NPS) ainsi obtenus sont ultrafiltrés sur une membrane de 30 Kd (Incelltech, France) et filtrés sur une cartouche 0.45  $\mu$ m (Millipore, France).

10 Dans le tableau 1 ci-dessous, le taux de charge des NPS obtenus est déterminé par analyse élémentaire du taux d'azote présent dans le gel.

Tableau 1

| Numéro | Rapport GTMA/unité glucose (%) | Charge finale (mEq/g) |
|--------|--------------------------------|-----------------------|
| NPS-1  | 26                             | 0,8                   |
| NPS-2  | 29                             | 1,0                   |
| NPS-3  | 38                             | 1,2                   |
| NPS-4  | 50                             | 1,4                   |

15 Ainsi en modulant le rapport initial GTMA/unité glucose il est possible de moduler la densité de charge des NPS cationiques.

20 Ces travaux et ceux réalisés sur d'autres polysaccharides, ont permis de démontrer qu'il est possible de modifier la densité de charge des NPS dans une gamme de 0 à 2 mEq/g correspondant à un rapport GTMA/unité glucose de 0 à 70%. Pour la synthèse des conjugués de l'invention, il est nécessaire que la charge soit comprise entre 0.6 et 1,8 mEq/g et de façon préférentielle entre 0,8 et 1,6 mEq/g.

25 Exemple 2 : Préparation de Nouveaux Polysaccharidiques Cationiques possédant différent taux de réticulation.

30 Le tableau 2 ci-dessous rapporte les différents NPS cationiques préparés selon l'exemple 1 avec des rapports molaires epichlorhydrine/unité glucose variable et un rapport GTMA/unité glucose constant (50%) permettant d'obtenir une charge de 1,4 mEq/g de gel.

Tableau 2

5

| Numéro | Rapport Epichlorhydrine/unité glucose (%) |
|--------|---|
| NPS-5  | 0   |
| NPS-6  | 6,7                                       |
| NPS-7  | 10,0                                      |
| NPS-8  | 12,5                                      |
| NPS-9  | 16,7                                      |

10

Ces travaux et ceux réalisés sur d'autres polysaccharides, ont permis de démontrer que les rapports utilisables sont compris entre 0 et 20% correspondant à la modification d'une unité glucose sur cinq. Pour la préparation des conjugués de l'invention le rapport est compris entre 6 et 20%, et préférentiellement entre 10 et 15%.

15

Exemple 3 : Préparation de Biovecteur Supramoléculaire dit "SMBV-light".

20

La préparation des biovecteurs se déroule en deux étapes principales : (1) la synthèse des Noyaux polysaccharidiques (NPS) cationiques, (2) l'association de lipides aux NPS, dite synthèse des biovecteurs (type light).

(1) Synthèse des NPS cationiques.

25

500 g de maltodextrines Glucidex (ROQUETTE) sont solubilisés avec 0.880 litres d'eau dans un réacteur thermostaté à 20°C sous agitation. Puis, l'on introduit environ 7 g de  $\text{NaBH}_4$  et on laisse 1 heure sous agitation.

30

220 ml de NaOH 10M sont rajoutés puis 30,25 ml d'épichlorhydrine (Fluka). Après 12 heures de réaction, 382,3 g de glycidyltriméthylammonium chloride

(Fluka) sont introduits et le mélange est maintenu sous agitation durant 10 heures.

Le gel est dilué avec 8 litres d'eau déminéralisée et neutralisé à l'acide acétique glacial.

5 L'hydrogel obtenu est broyé par l'intermédiaire d'un homogénéisateur à haute pression (RANNIE Lab). La pression exercée est de 400 bars. A l'issue de cette étape, les matrices dispersées ont un diamètre moyen de 60 nm.

10 La purification s'opère par des étapes successives de :

- microfiltration 0,45 µm pour éliminer les particules de taille trop importante, et

15 

- diafiltration à volume constant pour éliminer les petites molécules (sels, fragments polysaccharidiques).

Enfin, les NPS sont concentrés, récupérés dans des flacons stériles et conservés à -20°C.

20 (2) Synthèse des biovecteurs.

Les noyaux polysaccharidiques cationiques décongelés sont dilués avec de l'eau osmosée dans un réceptacle en verre dans la proportion de 1mg de NPS /1ml d'eau. La dispersion est placée dans un premier  
25 temps sous agitation magnétique (5-10 minutes) puis homogénéisée (RANNIE Minilab) à 400 bars durant 3 minutes. La dispersion de NPS est placée dans un bain-marie à 80°C.

30 Les lipides (exemple : mélange de lécithine de jaune d'oeuf/cholestérol), sous forme de poudre, sont pesés de telle sorte que la masse totale représente, par exemple 20% (w/w) de la masse des NPS. Les lipides constitutifs de la membrane sont mélangés et solubilisés



avec 2 ml d'éthanol 95% (v/v). Les lipides chargés représentent, par exemple, 5 % (w/w) des lipides totaux.

5 L'homogénéisateur, est amené à une température de 60°C minimum par circulation d'eau en circuit fermé.

Concomitamment, les NPS dispersés à 80°C sont soumis à une agitation magnétique et la solution éthanolique de lipide est injectée dans la dispersion de NPS.

10 L'eau de chauffage de circuit du l'homogénéisateur est évacuée et remplacée par la dispersion "NPS/lipides" à 80°C. Cette nouvelle dispersion est homogénéisée à 450 bars pendant 25 minutes en circuit fermé à 60°C minimum. A l'issue de  
15 cette étape, la préparation est introduite dans un ballon en verre puis soumise à basse pression à 60°C pour éliminer l'éthanol resté en solution. SI nécessaire, les biovecteurs obtenus peuvent être concentrés par ultrafiltration, lyophilisation ou  
20 évaporation.

Les biovecteurs cationiques ainsi obtenus sont alors entreposés dans des conditions stériles après filtration sur 0,2 µm.

25 Exemple 4 : Préparation de Biovecteur Supramoléculaire dit "SMBV-complet".

La préparation d'un SMBV-complet est celle décrite dans la demande de brevet européen No. 344 040, avec lécithine de jaune d'oeuf /cholestérol (80/20 p/p)-  
30 rapport Lipide/NPS 100%.

Dans ce mode de réalisation, on prépare les Biovecteurs Supramoléculaires dit "NPS" de l'exemple 3, que l'on soumet à une étape d'acylation pour obtenir des

NPS acylés. Après phospholipidation, on obtient les SMBV-complets.

5

Exemple 5 : Cytotoxicité des Noyaux Polysaccharidiques cationiques.

Protocole.

Différentes suspensions de NPS cationiques sont diluées dans un milieu de culture cellulaire (RPMI 1640, Gilco, France). Les suspensions obtenues sont alors mixées avec un volume équivalent de suspension cellulaire (100µL de Cellule HL60 à  $5 \cdot 10^4$  Cellules/ml). Les suspensions cellulaires ainsi préparées sont incubées 72 heures à 37°C dans un incubateur avec 5% de CO<sub>2</sub>.

Après incubation, les cellules sont lavées en PBS (10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 130 mM NaCl, 2 mM KCl, pH 7,4) et la viabilité cellulaire est déterminée par un test au MTT.

Chaque résultat est la moyenne de 2 expériences indépendantes effectuées sur six points d'expérimentation.

25

a) Effet de la charge des Noyaux Polysaccharidiques.

Les NPS de l'exemple 1 (rapport initial Epichlorhydrine/unité glucose de 10%) ont été utilisés pour montrer l'effet de charge sur la Cytotoxicité des NPS cationiques.

La figure 1 montre les courbes de réponse obtenues sur la lignée HL60 et pour des densités de charge comprise entre 0,8 et 1,4 mEq/g. Il apparaît que la toxicité cellulaire des NPS est observée pour des concentrations comprises entre 10 et 150 µg/ml (IC20 après 3 jours d'incubation,). Cependant, celle ci peut

être modulée par la densité de charges cationiques des NPS.

5

b) Effet du taux de réticulation.

La figure 2 donne les courbes de cytotoxicité obtenues avec les cellules HL60 et les NPS cationiques de l'exemple 2. Pour cette densité de charge (1,4 mEq/g) et pour des taux de réticulation variant de 0 à 16,7%, la toxicité cellulaire est observée pour des concentrations allant de 10 à 150 µg/ml (IC20). De même que pour l'effet de charge, la réticulation apparaît comme un paramètre important de la toxicité cellulaire des NPS cationiques.

c) Effet synergique de la Charge et du Taux de réticulation.

Le tableau 3 ci-dessous résume les résultats de Cytotoxicité observés sur lignée HL60 après 72 heures d'incubation pour différents NPS cationiques qui diffèrent par leur densité de charge et leur taux de réticulation. Les résultats sont exprimés en IC20, concentration de NPS qui inhibe 20% de la prolifération cellulaire 72 heures après incubation.

Tableau 3

| Numéro | Polysaccharide | Taux de réticulation* (%) | Charge (mEq/g) | IC20 (µg/ml) |
|--------|----------------|---------------------------|----------------|--------------|
| NPS-1  | Glucidex 2     | 10,0                      | 0,8            | >150         |
| NPS-2  | Glucidex 2     | 10,0                      | 1,0            | 90           |
| NPS-3  | Glucidex 2     | 10,0                      | 1,2            | 48           |
| NPS-4  | Glucidex 2     | 10,0                      | 1,4            | 12           |
| NPS-5  | Glucidex 2     | 0                         | 1,4            | 76           |
| NPS-6  | Glucidex 2     | 6,7                       | 1,4            | 17           |
| NPS-7  | Glucidex 2     | 10,0                      | 1,4            | 10           |
| NPS-8  | Glucidex 2     | 12,5                      | 1,4            | 8            |

|        |            |      |     |      |
|--------|------------|------|-----|------|
| NPS-9  | Glucidex 2 | 16,7 | 1,4 | 4    |
| NPS-10 | Tackidex   | 12,5 | 1,9 | 3    |
| NPS-11 | Tackidex   | 12,5 | 1,6 | 5    |
| NPS-12 | Tackidex   | 20,0 | 0,5 | >150 |
| NPS-13 | Glucidex 6 | 20,0 | 0,7 | 36   |
| NPS-14 | Glucidex 2 | 12,5 | 0,8 | >150 |
| NPS-15 | Glucidex 2 | 0    | 1,0 | >150 |

(\*rapport initial épichlorhydrine/unité glucose) et différentes charges des NPS cationiques.

Ces résultats indiquent qu'il existe un effet synergique entre Cytotoxicité induite par la densité de charge et par le taux de réticulation des NPS cationiques. Ainsi, il est possible de moduler la toxicité cellulaire des NPS cationiques en modulant les conditions de synthèse de ces NPS.

Pour la préparation des conjugués oligonucleotides/biovecteurs, la recherche d'une toxicité minimale et d'un rendement maximal d'association doit conduire à l'obtention d'un compromis. Celui-ci, peut-etre réalisé pour des charge comprises entre 0.8 et 1.6 mEq/g et des taux de réticualtion de 10 à 15%.

#### Exemple 6 : Chargement d'Oligonucléotide dans des NPS cationiques.

##### Méthodes.

Une solution d'oligonucléotide (antisens de 15 mer) à 2,5 mg/ml en eau est lentement ajoutée (5µl/ml toutes les heures) à une solution de NPS cationiques à 1 mg/ml maintenue à 45°C sous agitation magnétique. Ainsi, le rapport Oligonucléotide/NPS est de 5% (p/p). Après le dernier ajout d'oligonucléotide la préparation est incubée 1 heure sous agitation magnétique à 45°C.

La concentration en oligonucléotides libres est déterminée par spectrophotométrie après ultrafiltration des préparations. De même, afin de déterminer la stabilité du complexe vis à vis de la force ionique, la préparation est incubée en PBS (10 mM

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaCl 130 mM, KCl 2 mM, pH 7.4). Après cette incubation ( 30 min. à 37°C), les oligonucléotides libres et associés au NPS sont séparés par ultrafiltration et la concentration est déterminée par spectrophotométrie.

a) Effet de la charge des NPS cationiques.

La table 4 ci-dessous résume les résultats d'association obtenus pour différentes charges des NPS cationiques (0,6; 0,9 et 1,6 mEq/g) et montre l'influence de charge des NPS cationiques sur les rendements d'association et la stabilité en PBS des complexes oligonucléotide-NPS.

Tableau 4

|                         | 0,6 mEq/g<br>(n=9) | 0,9 mEq/g<br>(n=2) | 1,6 mEq/g<br>(n=9) |
|-------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Rdt D'association (%)   | 61,8 ± 11,5        | 80,2<br>± 12,4     | 89,7<br>± 6,0      |
| ODN libre après PBS (%) | 73 ± 14            | 78 ± 8             | 46 ± 9             |

Les résultats obtenus indiquent qu'il existe une relation étroite entre la charge des NPS et la qualité des conjugués NPS-oligonucléotide mesurée par les rendements d'association et leurs stabilités après incubation en PBS.

b) Effet du taux de réticulation.

La figure 3 donne les résultats obtenus lorsque les NPS de l'exemple 2 sont utilisés dans le protocole d'association.

Ces résultats indiquent que pour la charge utilisée, 1,4 mEq/g, le taux de réticulation a peu d'influence sur les rendements d'association. A l'inverse l'augmentation du rapport épichlorhydrine/unité de glucose permet d'améliorer progressivement la stabilité du complexe après incubation en PBS.

Ainsi, la synthèse du NPS optimal pour la formation des conjugués doit correspondre à un compromis entre la densité de charge du NPS et la réticulation du

polysaccharide afin de maximaliser les qualités du conjugué oligonucléotide-biovecteur et à minimaliser la toxicité cellulaire de ceux-ci.

5                    Exemple 7 : Obtention d'un protocole non-  
                  agrégatif lors de la préparation des conjugués  
                  oligonucléotide-biovecteurs.

10                    Des biovecteurs préparés comme dans  
                  l'exemple 4 sont conjugués à des oligonucléotides  
                  (antisens de 18 -mères) en utilisant le protocole décrit  
                  dans l'exemple 6 avec un rapport Oligonucléotide/NPS de  
                  10%. Cependant l'apport d'énergie est effectué suivant  
                  deux méthodes:

15                    Méthode 1 : Les oligonucléotides sont  
                  ajoutés à température ambiante dans un bain à ultrasons.

                  Méthode 2 : L'ajout des oligonucléotides est  
                  effectué sous agitation magnétique à 45°C.

20                    La méthode 1 aboutit à une agrégation des  
                  Biovecteurs, indiquant que les ultrasons ne sont pas  
                  suffisants pour dissocier les agrégats Biovecteurs/  
                  oligonucléotide. A l'inverse, la méthode 2 aboutit à un  
                  protocole de conjugaison non-agrégatif permettant  
                  d'obtenir des suspensions homogènes.

25                    Exemple 8 : Préparation d'un conjugué  
                  d'oligonucléotide et de Biovecteur

30                    La tableau 5 ci-dessous donne les  
                  caractéristiques des conjugués Oligonucléotide-  
                  Biovecteur obtenus en utilisant un oligonucléotide  
                  antisens [OligoDeoxyNucléotide (ODN) de 15 -mères] ou un  
                  Ribozyme (OligoRiboNucléotide (ORN) de 35 -mères), et  
                  les biovecteurs décrits à l'exemple 3 dont les NPS  
                  possèdent des caractéristiques définies (par exemple une  
35                    charge de 0,8 mEq/g et un taux de réticulation de  
                  12,5 %).

Le protocole d'association utilisé correspond au protocole de l'exemple 6. Cependant, la solution d'oligonucléotide est ajoutée à raison de 10 µl/ml, toutes les heures pour 4 heures d'incubation. Ainsi, le rapport oligonucléotide/NPS est maintenu à 10%.

Tableau 5

|                                     | Ribozyme   | Antisens   |
|-------------------------------------|------------|------------|
| Rendement d'association (%)         | 98,0 ± 2,0 | 99,3 ± 2,1 |
| Oligonucleotide libre après PBS (%) | 9,3 ± 3,6  | 5,3 ± 3,5  |
| Filtrabilité (%)                    | 95,0 ± 2,4 | 98,2 ± 2,4 |
| Diamètre moyen (nm)                 | 89 ± 3     | 85 ± 5     |

Les résultats montrent que la nature des oligonucléotides, en particulier leur taille (nombre de mères) et leur structure (antisens versus Ribozyme), a peu d'influence sur les caractéristiques des conjugués oligonucléotides-biovecteurs. De plus, ces résultats confirment que le protocole d'association utilisé, qui est un protocole non-agrégatif, permet d'obtenir des conjugués stérilisables par filtration sur membrane 0,2 µm.

Ainsi dans un protocole de conjugaison utilisant :

- des biovecteurs à une concentration exprimée en NPS cationique comprise entre 1 et 20 mg/ml,
- des oligonucléotides (par exemple des oligonucléotides antisens ou des ribozymes) à une concentration comprise entre 1 et 20 mg/ml,
- un rapport oligonucléotide/NPS cationique compris entre 2 et 40%, et préférentiellement entre 5 et 20%,
- une cinétique d'ajout de la solution d'oligonucléotide comprise entre 5 µl/ml/h et 300 µl/ml/h,
- une température d'incubation comprise entre 20°C et 60°C, et préférentiellement entre 40°C et 50°C,

on obtient des conjugués de l'invention dont les caractéristiques fonctionnelles sont remarquables.

Exemple 9 : Protection des oligonucléotides après conjugaison avec les biovecteurs

Des oligonucleotides (phosphodiester, 15 mères, Genset, France) sont marqués au phosphore 32 par la méthode suivante : marquage de l'extrémité 5' avec de l'ATP-[ $g^{32}P$ ] par la T4 polynucléotide kinase (Boehringer Mannheim, France), suivi d'une purification sur colonne d'exclusion.

Ces oligonucléotides libres ou conjugués avec des Biovecteurs (rapport Oligonucléotide/ NPS 10%) sont incubés à une concentration de 6,25  $\mu g/ml$  dans différents milieux :

- RPMI 1640 + 10% de Sérum de veau foetal
- RPMI 1640 + 10% de sérum de veau foetal inactivé (Contrôle négatif)
- Plasma humain

A différents temps, les échantillons sont prélevés, chauffés à 65°C pour détruire les activités nucléasiques, et conservés à 4°C jusqu'à l'analyse. Les échantillons sont analysés par électrophorèse sur gel acrylamide (20%). Les gels sont autoradiographiés et quantifiés sur Kodak DSC 200 système.

La figure 4 montre que la conjugaison des oligonucléotides aux Biovecteurs permet d'obtenir une protection efficace contre les nucléases. En effet, les oligonucléotides libres sont rapidement dégradés dans les milieux contenant du sérum actif. Ainsi, dans ces milieux la dégradation de l'oligonucléotide libre est totale après 45 minutes d'incubation. A l'inverse après conjugaison aux biovecteurs, la dégradation complète des oligonucléotides est obtenue après 6 à 8 heures d'incubation.



Le même type de profil peut être obtenu après incubation dans du plasma humain, le temps de demie-vie passant de 120 min. à 225 min., respectivement pour l'oligonucléotide libre et conjugué aux Biovecteurs.

Exemple 10 : Pénétration cellulaire des conjugués oligonucléotides/Biovecteurs.

Protocole.

Des conjugués Biovecteurs/oligonucléotides sont préparés avec un Oligonucléotide marqué à la fluorescéine (phosphodiester, 18 mères, Genset, France). Les oligonucléotides, soit libres, soit conjugués aux biovecteurs sont incubés avec  $2 \times 10^5$  cellules MCF7 (carcinome mammaire humain) à la concentration de 0.78 et 6.25 µg/ml.

Après incubation des cellules à 37°C, celles-ci sont collectées par trypsinisation et lavées en PBS. Les cellules sont alors incubées pour 40 min. en monensine (20µm) et analysées par cytométrie en flux possédant un laser d'excitation à 488 nm et un filtre d'émission à 530 nm (Becton Dickinson, France). Les résultats sont exprimés en unité arbitraire de fluorescence obtenue pour  $10^4$  cellules vivantes.

La figure 5 donne les résultats obtenus et montre la capacité des Biovecteurs à augmenter la pénétration cellulaire des oligonucléotides. En particulier, de façon attendue, la pénétration cellulaire des oligonucléotides est extrêmement faible. A l'inverse, une pénétration cellulaire efficace de l'oligonucléotide peut être obtenue après conjugaison au Biovecteur. Cette pénétration est liée à la concentration en conjugué oligonucléotide-Biovecteur et au temps d'incubation du conjugué et des cellules.

L'association de ces propriétés du conjugué Oligonucléotide-biovecteur, stabilisation de

l'oligonucléotide face à l'action des nucléases et pénétration cellulaire, est certainement le point important pour l'amélioration de l'activité biologique des oligonucléotides dans les stratégie antisens et ribozymes.

Exemple 11 : Activité des conjugués  
Antisens-Biovecteur sur lignée HL60

Des biovecteurs sont préparés selon le protocole décrit à l'exemple 3 dont les NPS possèdent des caractéristiques définies (par exemple une charge de 0,8 mEq/g et un taux de réticulation de 12,5 %)..

Un antisens ciblant l'ARNm de l'oncogène c-myc (15 mères phosphorothioate, Lynx Therapeutics, Californie) est conjugué à ces biovecteurs selon le protocole décrit à l'exemple 6, avec un rapport oligonucléotide/NPS de 5%.

Les Biovecteurs non conjugués, l'oligonucléotide libre ou conjugué aux biovecteurs, sont incubés à 37°C avec  $5 \cdot 10^5$  cellules (lignée HL60) à la concentration de 1µM dans le milieu de culture (RPMI1640 + 10% de sérum de veau foetal). A différent temps, les cellules sont prélevées, lavées en PBS et la prolifération cellulaire est déterminée par un test au MTT.

Les résultats rapportés à la figure 6 montrent une nette amélioration de l'activité antisens qui s'exprime par une inhibition de la prolifération cellulaire au cours du temps. Il important de noter que pour la concentration utilisée (1 µM), l'oligonucléotide libre n'est pas capable d'exprimer cette activité. A l'inverse, les conjugués oligonucleotide-biovecteurs dans les conditions permettent d'inhiber la prolifération cellulaire pendant les cinq jours de l'expérience.

L'oligonucléotide utilisé dans ces expériences étant un oligonucléotide phosphorathioate, par nature résistant aux nucléases présentes dans le milieu de culture, cette amélioration de l'activité antisens semble bien être due, à l'augmentation de la concentration cellulaire en oligonucléotides.

Exemple 12 : Activité cellulaire des conjugués Ribozyme Biovecteur.

Des biovecteurs sont préparés selon le protocole décrit à l'exemple 3 dont les NPS possèdent des caractéristiques définies (par exemple une charge de 0,8 mEq/g et un taux de réticulation de 12,5 %).

Des ribozymes ciblant le mRNA de l'oncogène c-myb (Ribozyme Pharmaceutical Inc., Boulder, Colorado) sont conjugués à ces biovecteurs selon le protocole décrit à l'exemple 6 avec un rapport oligonucléotide/NPS de 5%. De plus, trois contrôles négatifs sont préparés dans les mêmes conditions, un conjugué de Ribozyme inactif, Ribozyme incapable de effectuer la coupure catalytique du mRNA, un conjugué de "scrambled" Ribozyme, Ribozyme incapable de reconnaître la séquence du c-myb, et des biovecteurs vides. Par comparaison à l'art antérieur, les ribozymes actifs et inactifs sont conjugués à de la lipofectamine.

Dans ces expériences,  $2.10^5$  cellules RSMC (rat smooth muscle cell) sont incubées en milieu de culture sans sérum (Optimem). Après 48 heures d'incubation, 100  $\mu$ l d'Optimem contenant des concentrations variables de Ribozymes sont ajoutés aux cellules. Après une nouvelle incubation de 24 heures (3 heures pour la lipofectamine), la prolifération cellulaire est stimulée en plaçant les cellules dans un milieu de culture complété avec 10% de sérum de veau foetal. La prolifération cellulaire est déterminée par un test au 5 Bromo deoxy Uridine (BrdU).

Les figures 7a et 7b montrent la courbe de réponse obtenue pour les conjugués Ribozyme-Biovecteurs, des Ribozymes-lipofectamine, ainsi que pour différents contrôles, Biovecteur vide ou conjugué avec des ribozymes inactifs. Dans les mêmes conditions les Ribozymes actifs ou inactifs non conjugués aux biovecteurs ne présentent aucune inhibition de la prolifération cellulaire. Dans les mêmes conditions, la lipofectamine présente une toxicité importante, qui d'une part ne permet pas d'accroître la concentration en ribozymes, et d'autre part rend difficile la comparaison d'activité des ribozymes actifs et inactifs.

Ainsi, les biovecteurs permettent d'augmenter considérablement l'activité biologique des ribozymes, de manière avantageuse par rapport à l'art antérieur.

Exemple 13 : Inhibition spécifique de la synthèse d'une protéine par un antisens conjugué aux biovecteurs.

Des biovecteurs sont préparés selon le protocole décrit à l'exemple 4 dont les NPS possèdent des caractéristiques définies (par exemple une charge de 1,6 mEq/g et un taux de réticulation de 10 %)..

Deux conjugués d'oligonucléotide-biovecteurs sont préparés à partir d'un antisens phosphorothioate ciblant le mRNA du pro-oncogène Erb2 (15 mères, Genset, France) et de la même séquence antisens phosphodiester (15 mères, Genset, France). Parallèlement, les conjugués témoins, "scrambled" séquence conjuguée aux Biovecteurs, et Biovecteur vides, ont été préparés. Ces différents conjugués sont préparés selon le protocole décrit à l'exemple 6 avec un rapport oligonucléotide/NPS de 10%. Par comparaison, les mêmes antisens sont conjugués à du DOTAP.

Dans ces expériences,  $7.10^4$  cellules SK-Br3 (lignée d'un adénocarcinome humain qui sur-exprime la protéine P185-Erb2) dans 300µl de RPMI 1640 (Gilco, France) sont incubées en présence des différentes préparations : conjugué oligonucléotide Biovecteur, oligonucléotide libre ou Biovecteur libre. Les incubations sont effectuées à la concentration de 180µg/ml de Biovecteur correspondant à une concentration de 3µM en oligonucléotide. Après 5 heures d'incubation, 1 ml de RPMI 1640 complété avec 5% de sérum de veau foetal est ajouté aux suspensions cellulaires et les cellules sont de nouveau incubées à 37°C.

Après 72 heures d'incubation, les cellules sont testées pour la présence de la protéine P185-Erb2. Pour ce test, les cellules sont collectées, lavées en PBS et incubées en présence d'un anticorps anti Erb-2 (OP39, Oncogene Science, France). L'analyse des cellules est réalisée au cytomètre en flux après révélation par un deuxième anticorps marqué à la fluorescéine.

Les résultats obtenus et présentés à la figure 8 montrent l'apport de la conjugaison aux biovecteurs dans l'expression de l'activité biologique d'un antisens. Il est particulièrement notable qu'il n'existe pas de différence significative entre l'activité des antisens phosphodiester et phosphorothioate. Cette absence de différence est certainement l'expression de la protection de l'oligonucléotide après conjugaison aux Biovecteurs. D'autre part, les antisens sont deux fois plus actifs après conjugaison aux Biovecteurs qu'après conjugaison aux lipides cationiques classiquement utilisés (DOTAP).

Exemple 14 : Activité biologique in-vitro d'un antisens conjugué aux biovecteurs (Modèle Erb-2).

Des conjugués oligonucléotides-biovecteurs sont préparés dans les conditions décrites à l'exemple

13 et en utilisant le dérivé phosphorothioate de cet exemple.

Pour ces expériences de prolifération, 5 x 10<sup>3</sup> cellules SK-Br3 dans 60 µl de RPMI 1640 (Gilco, France) sont incubées en présence des différentes préparations, conjugué d'oligonucléotide phosphorothioate et de biovecteur, d'oligonucléotide phosphorothioate libre ou biovecteur libre. Les incubations sont effectuées à la concentration de 180µg/ml de biovecteur correspondant à une concentration de 3µM en oligonucléotide. Après 5 heures d'incubation, 200µl de RPMI 1640 complémenté avec 5% de sérum de veau foetal sont ajoutés aux suspensions cellulaires et les cellules sont de nouveau incubées à 37°C.

A différents temps, 24, 48, 72, 96 et 120 heures, les cellules sont collectées par trypsinisation et comptées sur un compteurs de cellules (Coultronics, France). Les résultats sont la moyenne de six points expérimentaux.

La figure 9 montre la courbe de prolifération des cellules après traitement avec les différentes préparations. Dans ces conditions, l'oligonucléotide libre est incapable d'inhiber la prolifération cellulaire. Il est notable que l'oligonucléotide ciblant un oncogène permette, après conjugaison aux biovecteurs, d'inhiber complètement la prolifération cellulaire de cette lignée tumorale.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1) Uhlmann, E., & Peyman, A. (1990) *Chem. Rev.*, 90, 543-583.
- 5 2) Wagner, R. W (1994) *Nature*, 372, 333-335.
- 3) Stein, C. A., & Cohen, J.S. (1988) *Cancer Res.*, 48, 2659-2668.
- 4) Hélène, C., & Toulmé, J.J. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, 1049, 99-125.
- 10 5) Thuong, N. T., & Hélène, C. (1993) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 32, 666-690.
- 6) Pantopoulos, K., Johansson, H. E., & Hentze, M. W. (1994) *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.*, 48, 181-238.
- 15 7) Stein, C. A., & Cheng, Y.-C. (1993) *Science*, 261, 14004-1012.
- 8) Gura, T. (1995) *Science*, 270, 575-577.
- 9) Woolf, T. D. (1995) *Antisense Res. Dev.*, 5, 227-232.
- 20 10) Miller, P. S. (1996) *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.*, 52, 261-291.
- 11) Melton, D. A. (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 144-148.
- 12) Maher, J., & Dolnick, B. J. (1988) *Nucleic Acids Res.*, 16, 3341-3358.
- 25 13) Liebhaber, S. A., Cash, F., Eshleman, S. S. (1992) *J. Mol. Biol.*, 226, 609-621.
- 14) Johansson, H. E., Belsham, G.J., Sproat, B. S., & Hentze M. W. (1994) *Nucleic Acids Res.*, 22, 4591-4598.
- 30 15) Bonham, M. A., Brown, S., Boyd, A. L., Brown, P. H., Bruckenstein, D. A., Hanvey, J. C., Thomson, S. A., Pipe, A., Hassman, F., Bisi, J. E., Froehler, B. C., Matteucci, M. D., Wagner, R. W., Noble, S. A., & Babiss, L. E. (1995) *Nucleic Acids Res*, 23, 1197-1203.
- 35

- 16) Hélène, C and Toulmé, J .J. (1990)  
*Biochim. Biophys. Acta* 1049, 99-125.
- 17) Stein C. A. and Cheng, Y. C. (1993)  
*Science* 261, 1004-1012.
- 5 18) Stein C. A. and Cheng, Y. C. (1988)  
*Cancer Res.* 48, 2659-68.
- 19) Simons M., Edelman, E. R., DeKeyser, J.  
L., Langer, R. and Rosenberg, R. D. (1992) *Nature* 359,  
67-70.
- 10 20) Whitesell, L. Geselowitz, D., Chavany,  
C., Fahmi, B., Walbridge, S., Alger, J. R. and Neckers,  
L. M. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4665-4669.
- 21) Stein, C.A. and Krieg, A.M. (1994)  
*Antisense Res. Dev.* 4, 67-69.
- 15 22 ) Stein, C.A. (1995) *Nature Medicine* 1,  
1119-1121.
- 23 ) Vlassov, V.V., Balakireva, L.A. and  
Yakubov, L.A. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1197, 95-  
108.
- 20 24) Léonetti, J.P., Degols, G., Clarenc,  
J.P., Mechti, N. and Lebleu, B. (1993) *Prog. Nucl. Acid.  
Res. Mol. Biol.* 44, 143-66.
- 25 25) Wagner, R.W. (1994) *Nature* 372, 333-335.
- 26) Uhlmann, E. and Peyman, A. (1990) *Chem.  
Rev.* 90, 544-584.
- 27) Clarenc, J.P., Degols, G., Léonetti,  
J.P., Milhaud, P. and Lebleu, B. (1993) *Anticancer Drug  
Res.* 8, 81-94.
- 30 28) Cazenave, C., Stein, C.A., Loreau, N.,  
Thuong, N.T., Neckers, L.M., Subasinghe, C. Hélène, C.,  
Cohen, J.S. and Toulmé, J.J. (1989) *Nucleic Acids Res.*  
17, 4255-4273.
- 29) Iversen, P.L., Mata, J., Tracewell, W.G.  
and Zon, G. (1994) *Antisense Res. Dev.* 4, 43-52.



- 30) Srinivasan, S.K. and Iversen, P. (1995) J. Clin. Lab. Anal. 9, 129-137.
- 31) Bayever, E. and Iversen, P. (1995) J. Clin. Lab. Anal. 9, 129-137.
- 5 32) Watson, P.H., Pon, R.T. and Shiu, R.P. (1992) Exp. Cell Res. 202, 391-7.
- 33) Storey, A., Oates, D., Banks, L., Crawford, L. and Crook, T. (1991) Nucleic Acids Res. 19, 4109-4114.
- 10 34) Thierry, A.R. and Dritschilo, A. (1992) Nucleic Acids Res. 20, 5691-8.
- 35) Zelphati, O., Imbach, J.L., Signoret, N., Zon, G., Rayner, B. and Leserman, L. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 4307-4314.
- 15 36) Ropert, C., Lavignon, M., Dubernet, C., Couvreur, P. and Malvy, C. (1992) Biochem. Biophys. Res. Commun. 183, 879-885.
- 37) Léonetti, J.P., Machy, P.; Degols, G., Lebleu, B. and Leserman, L. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 2448-2451.
- 20 38) De Smidt, P., Le Doan, T., De Falco, S. and Van Berkel, T. (1991) Nucleic Acids Res. 19, 4695-700.
- 39) Krieg, A.M., Tonkinson, J., Matson, S., Zhao, Q., Saxon, M., Zhang, L.M., Bhanja, U., Yakubov, L. and Stein, C.A. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1048-1052.
- 25 40) Dean, N.M. and McKay, R. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 11762-11766.
- 30 41) Capaccioli, S., Dipasquale, G., Mini, E., Mazzei, T. and Quattrone, A. (1993) Biochem. Biophys. Res. Commun. 197, 818-825.

42) Yeoman, L.C., Dannels, Y.J. and Lynch, M.J. (1992) Antisense Res. Dev. 2, 51-59.

43) Saijo, Y., Perlaky, L., Wang, H.M. and Busch, H. (1994) Oncol. Res. 6, 243-249.

5                   44) Chavany, C. Saison-Behmoaras, T., Ledoan, T., Puisieux, F., Couvreur, P. and Hélène, C. (1994) Pharm. Res. 11, 1370-1378.

10                   45) Schwab, G., Chavany, C., Duroux, I., Goubin, G., Lebeau, J., Hélène, C. and Saison-Behmoaras, T. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 10460-10464.

## REVENDEICATIONS

1) Conjugué ionique, stable dans un milieu biologique, d'un vecteur particulaire comprenant au moins un noyau hydrophile non liquide cationique et d'oligonucléotides polyanioniques.

2) Conjugué selon la revendication 1, caractérisé en ce que le vecteur particulaire comprend au moins un noyau hydrophile non liquide constitué d'une matrice de polysaccharides ou d'oligosaccharides naturellement ou chimiquement réticulés dont le taux de réticulation est sensiblement celui obtenu par réticulation avec entre 5 et 20% de mole d'épichlorhydrine par mole d'ose dans les polysaccharides ou oligosaccharides.

3) Conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que le vecteur particulaire comprend au moins un noyau hydrophile non liquide constitué d'une matrice de polysaccharides ou d'oligosaccharides naturellement ou chimiquement réticulés et modifiés par des ligands cationiques, dont le taux de charges positives est compris entre 0,6 à 1,8 milliEquivalent de charges positives par gramme de noyau.

4) Conjugué d'un vecteur particulaire et d'oligonucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le vecteur particulaire comprend au moins un noyau hydrophile non liquide constitué d'une matrice de polysaccharides ou d'oligosaccharides naturellement ou chimiquement réticulés et modifiés par des ligands cationiques, dont le taux de charges positives est compris entre 0,6 à 1,8 milliEquivalent de charges positives par gramme de noyau

et le taux de réticulation est sensiblement celui obtenu par réticulation avec entre 5 et 20% de mole d'épichlorhydrine par mole d'ose dans les polysaccharides ou oligosaccharides, et en ce que ledit vecteur particulaire est conjugué par des liaisons ioniques stables en milieu biologique à des oligonucléotides polyanionique protégés par ledit vecteur particulaire, lesdits oligonucléotides polyanioniques étant capables de s'hybrider à un ARNm cellulaire.

5) Conjugué selon l'une des revendications 3 ou 4, caractérisé en ce que le taux de charges positives est compris entre 0,8 et 1,6 milliEquivalent de charges positives par gramme de noyau

6) Conjugué selon l'une quelconque des revendications 2 à 5, caractérisé en ce que les polysaccharides de la matrice sont choisis dans le groupe comprenant le dextrane, l'amidon, la cellulose, leurs dérivés et substitués, leurs produits d'hydrolyse et leurs sels et esters.

7) Conjugué selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le noyau hydrophile non liquide est recouvert en totalité ou en partie d'au moins une couche de composés amphiphiles.

8) Conjugué selon la revendication 7, caractérisé en ce que les composés amphiphiles sont choisis parmi les lipides et phospholipides naturels ou synthétiques, les céramides, les acides gras, les glycolipides, les lipoprotéines et les tensioactifs.

35

5 9) Conjugué selon les revendications 7 ou 8, caractérisé en ce que le noyau hydrophile non liquide est recouvert en totalité ou en partie d'une couche externe constituée essentiellement de phospholipides naturels ou synthétiques et/ou de céramides, éventuellement associés à d'autres composés amphiphiles.

10 10) Conjugué selon les revendications 7 ou 8, caractérisé en ce que le noyau hydrophile non liquide est recouvert en totalité ou en partie d'une couche externe constituée d'acides gras naturels fixés au noyau par des liaisons covalentes.

15 11) Conjugué selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le noyau hydrophile non liquide est recouvert en totalité ou en partie de deux couches de composés amphiphiles.

20 12) Conjugué selon la revendication 11, caractérisé en ce que le noyau hydrophile non liquide est couvert en totalité ou en partie d'une première couche d'acides gras, elle-même recouverte en totalité ou en partie d'une couche lipidique.

25 13) Conjugué selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend, associé au noyau et/ou à une couche externe, un principe actif utile pour le transport, l'adressage ou la présentation du conjugué au niveau de la membrane  
30 de la cellule et/ou dans le cytoplasme de celle-ci.

35 14) Conjugué selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les oligonucléotides sont des oligodésoxyribonucléotides ou des oligoribonucléotides, antisens ou ribozymes, éventuellement marqués, naturels ou modifiés dès lors

que le marquage ou la modification ne change pas substantiellement leur caractère polyanionique.

5                   15) Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend un ou plusieurs conjugués selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 ou un sel pharmaceutiquement acceptable dudit conjugué, dispersé dans des excipients pharmaceutiquement acceptables.

10                   16) Conjugué selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 ou composition selon la revendication 15, destiné à être utilisé pour adresser un oligonucléotide dans une cellule.

15                   17) Vecteur particulaire comprenant au moins un noyau hydrophile non liquide cationique constitué d'une matrice de polysaccharides ou d'oligosaccharides naturellement ou chimiquement réticulés portant une charge globale cationique, présentant au moins une des caractéristiques suivantes :

20                   - le taux de réticulation est sensiblement celui obtenu par réticulation avec entre 5 et 20% de mole d'épichlorhydrine par mole d'ose dans les polysaccharides ou oligosaccharides;

25                   - ladite matrice de polysaccharides ou d'oligosaccharides naturellement ou chimiquement réticulés est modifiée par des ligands cationiques, dont le taux de charges positives est compris entre 0,6 à 1,8 milliEquivalents et avantageusement entre 0,8 et 1,6

30                   milliEquivalent de charges positives par gramme de noyau.

35                   18) Vecteur particulaire selon la revendication 17, caractérisé en ce que les polysaccharides de la matrice sont choisis dans le groupe comprenant le dextrane, l'amidon, la cellulose,

leurs dérivés et substitués, leurs produits d'hydrolyse et leurs sels et esters.

5                   19) Vecteur particulière selon l'une des revendications 17 ou 18, caractérisé en ce que le noyau hydrophile non liquide est recouvert en totalité ou en partie d'au moins une couche de composés amphiphiles.

10                   20) Vecteur particulière selon la revendication 19, caractérisé en ce que les composés amphiphiles sont choisis parmi les lipides et phospholipides naturels ou synthétiques, les céramides, les acides gras, les glycolipides, les lipoprotéines et les tensioactifs.

15                   21) Vecteur particulière selon les revendications 19 ou 20, caractérisé en ce que le noyau hydrophile non liquide est recouvert en totalité ou en partie d'une couche externe constituée essentiellement  
20 de phospholipides naturels ou synthétiques et/ou de céramides, éventuellement associés à d'autres composés amphiphiles.

25                   22) Vecteur particulière selon les revendications 20 ou 21, caractérisé en ce que le noyau hydrophile non liquide est recouvert en totalité ou en partie d'une couche constituée d'acides gras naturels fixés au noyau par des liaisons covalentes.

30                   23) Vecteur particulière selon la revendication 22, caractérisé en ce que la couche d'acides gras est elle-même recouverte en totalité ou partie d'une couche lipidique.

35                   24) Utilisation d'un vecteur particulière comprenant au moins un noyau hydrophile non liquide

cationique, pour adresser un oligonucléotide dans une cellule.

5                   25) Utilisation selon la revendication 24, dans laquelle le vecteur particulaire est un vecteur selon l'une quelconque des revendications 17 à 23.

10                   26) Utilisation selon l'une des revendications 24 ou 25, caractérisé en ce que les oligonucléotides sont des oligodésoxyribonucléotides ou des oligoribonucléotidesribozymes, antisens ou ribozymes, éventuellement marqués, naturels ou modifiés dès lors que le marquage ou la modification ne change pas substantiellement leur caractère polyanionique.

15                   27) Procédé de préparation d'un conjugué ionique, stable dans un milieu biologique, d'un vecteur particulaire comprenant au moins un noyau hydrophile non liquide cationique et de séquences courtes d'acide nucléique polyanioniques, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 20                   a) la préparation du noyau cationique :
- en mélangeant un polymère hydrophile, de nature polysaccharidique ou oligosaccharidique, chimiquement ou naturellement réticulé avec un agent de réticulation dans un rapport compris entre 0,06 et 0,2 mole, et de préférence entre 0,1 et 0,15 mole, d'agent de réticulation par unité d'ose dans le polysaccharide ou l'oligosaccharide,
  - 25                   - en ajoutant au mélange ci-dessus un ligand cationique de façon à obtenir un taux de charge du noyau compris entre 0,6 et 1,8 et de préférence entre 0,8 et 1,6 millEquivalent par gramme de noyau;
  - 30                   b) le chargement des oligonucléotides polyanioniques :
  - 35



- en ajoutant, sous agitation, au noyau préparé à l'étape (a), entre environ 0,02 et 0,4 gramme, et de préférence entre 0,05 et 0,2 gramme, d'oligonucléotide par gramme de noyau, selon un débit compris entre environ 0,25 µg d'oligonucléotide par mg de noyau et par heure et 6mg par mg de noyau et par heure, et de préférence entre 4µg/mg/heure et 1 mg/mg/heure, à une température comprise entre environ 20°C et 60°C et de préférence entre 40°C et 50°C.

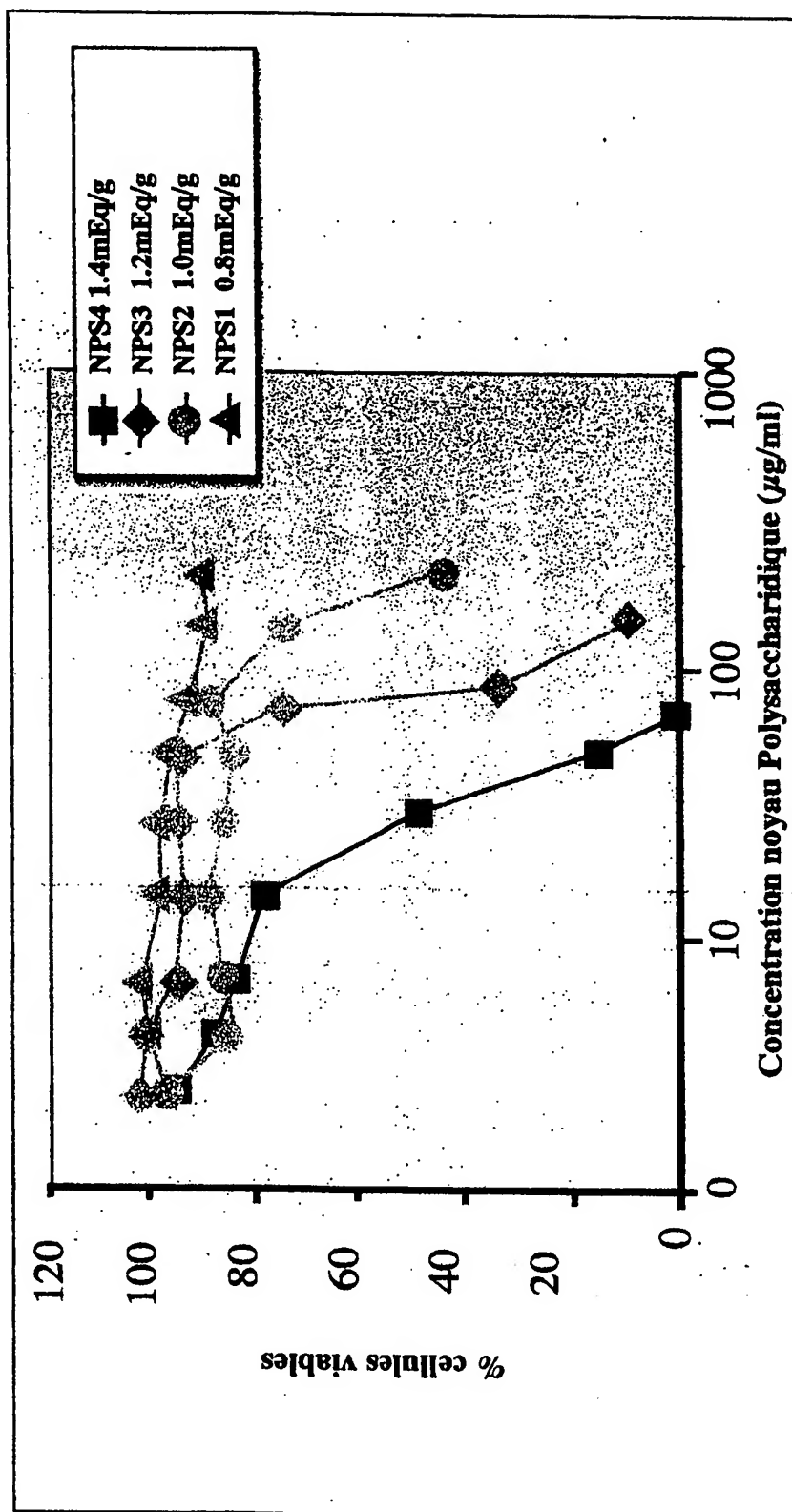
28) Procédé selon la revendication 27, caractérisé en ce que avant l'étape (b), on greffe sur la totalité ou sur une partie du noyau préparé à l'étape (a) une couche constituée de composés amphiphiles.

29) Procédé selon la revendication 28, caractérisé en ce que l'on greffe sur la totalité ou une partie de la première couche recouvrant le noyau une seconde couche constituée de composés amphiphiles.

30) Procédé selon l'une quelconque des revendications 27 à 29, caractérisé en ce que l'étape (b) consiste à ajouter à des vecteurs particuliers préparés conformément à l'étape (a) avec ou sans couche(s) externes de composés amphiphiles, dont la concentration exprimée en noyau cationique est comprise entre 1 et 20 mg/ml, une solution d'oligonucléotides à une concentration comprise entre 1 et 20 mg/ml, de façon à obtenir un rapport oligonucléotides/vecteurs particuliers compris entre 2 et 40%, et de préférence entre 5 et 20%, selon une cinétique d'ajout de la solution d'oligonucléotide comprise entre 5 µl/ml/h et 300 µl/ml/h, et à une température d'incubation comprise entre 20°C et 60°C, et préférentiellement entre 40°C et 50°C,

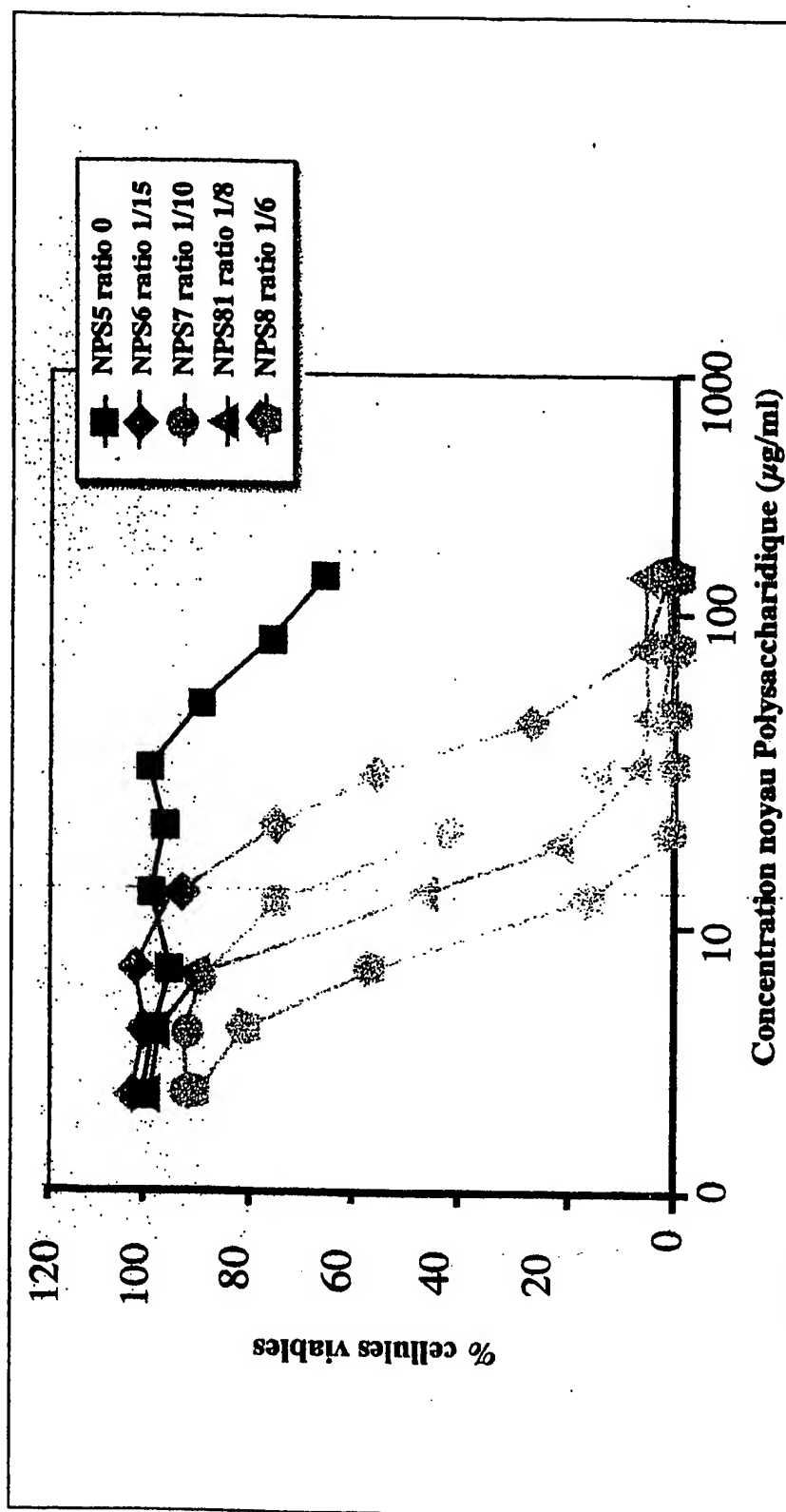
# Effet charge ionique

Fig.1



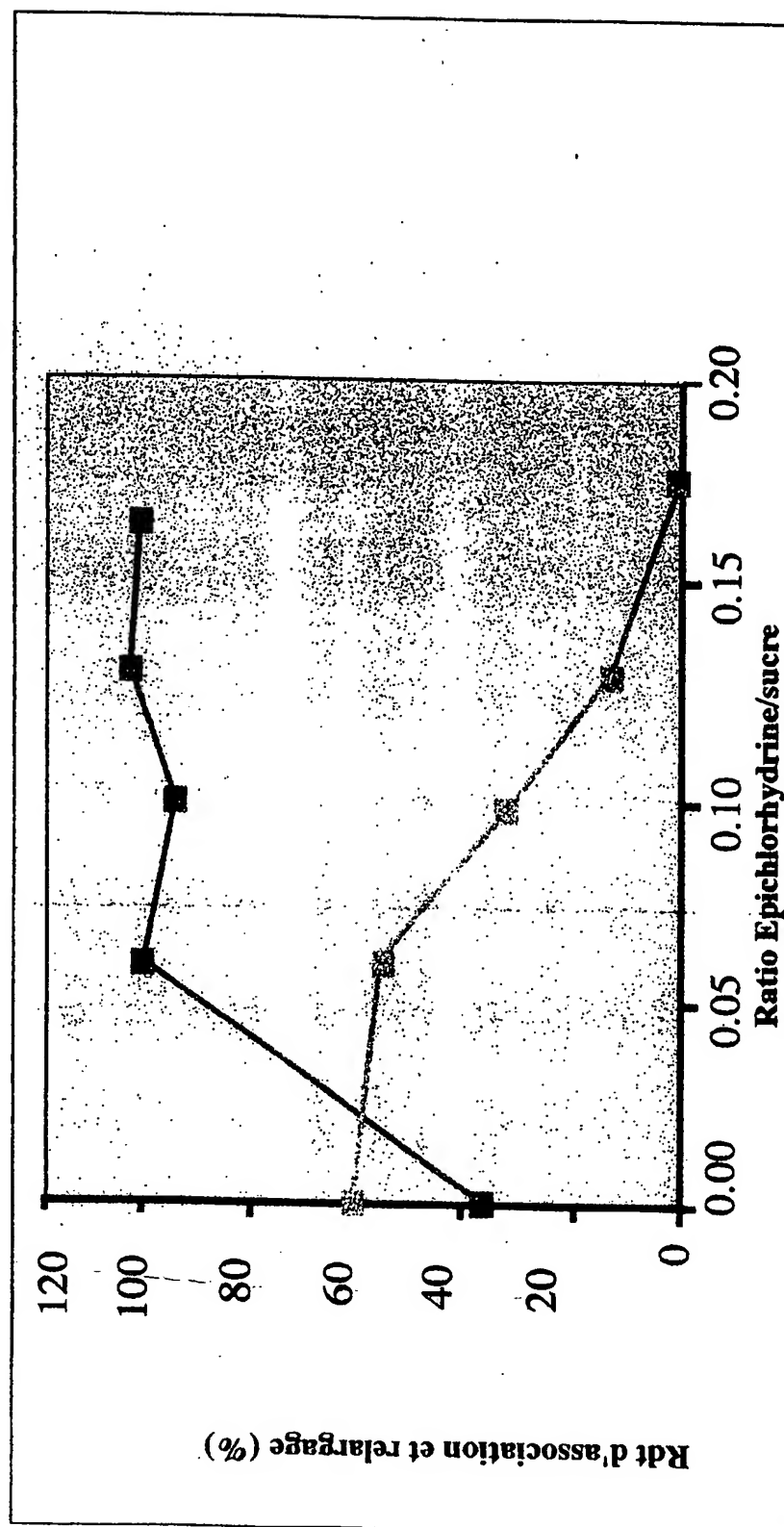
**Effet taux réticulation**

Fig.2



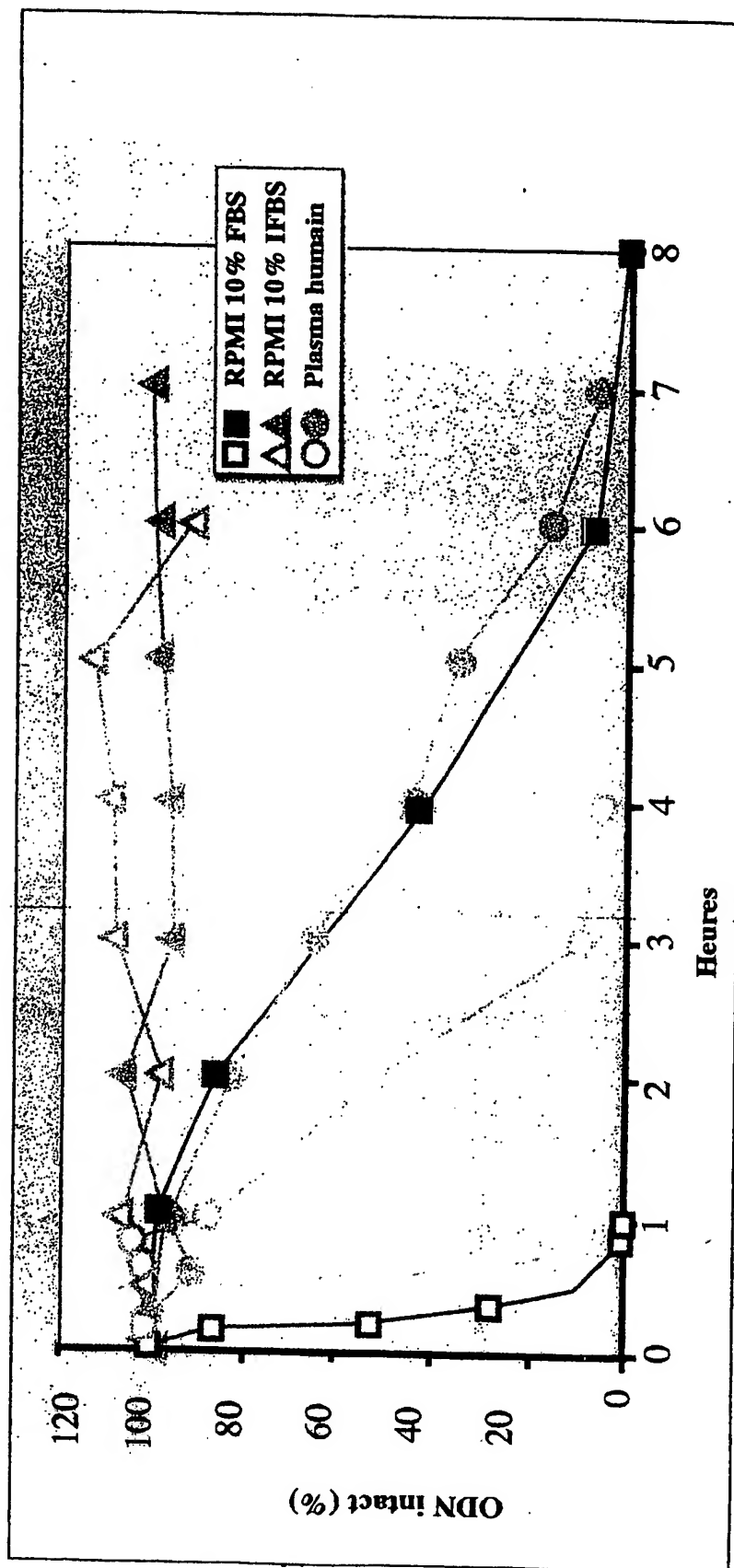
# Effet de taux de réticulation sur le chargement

Fig.3



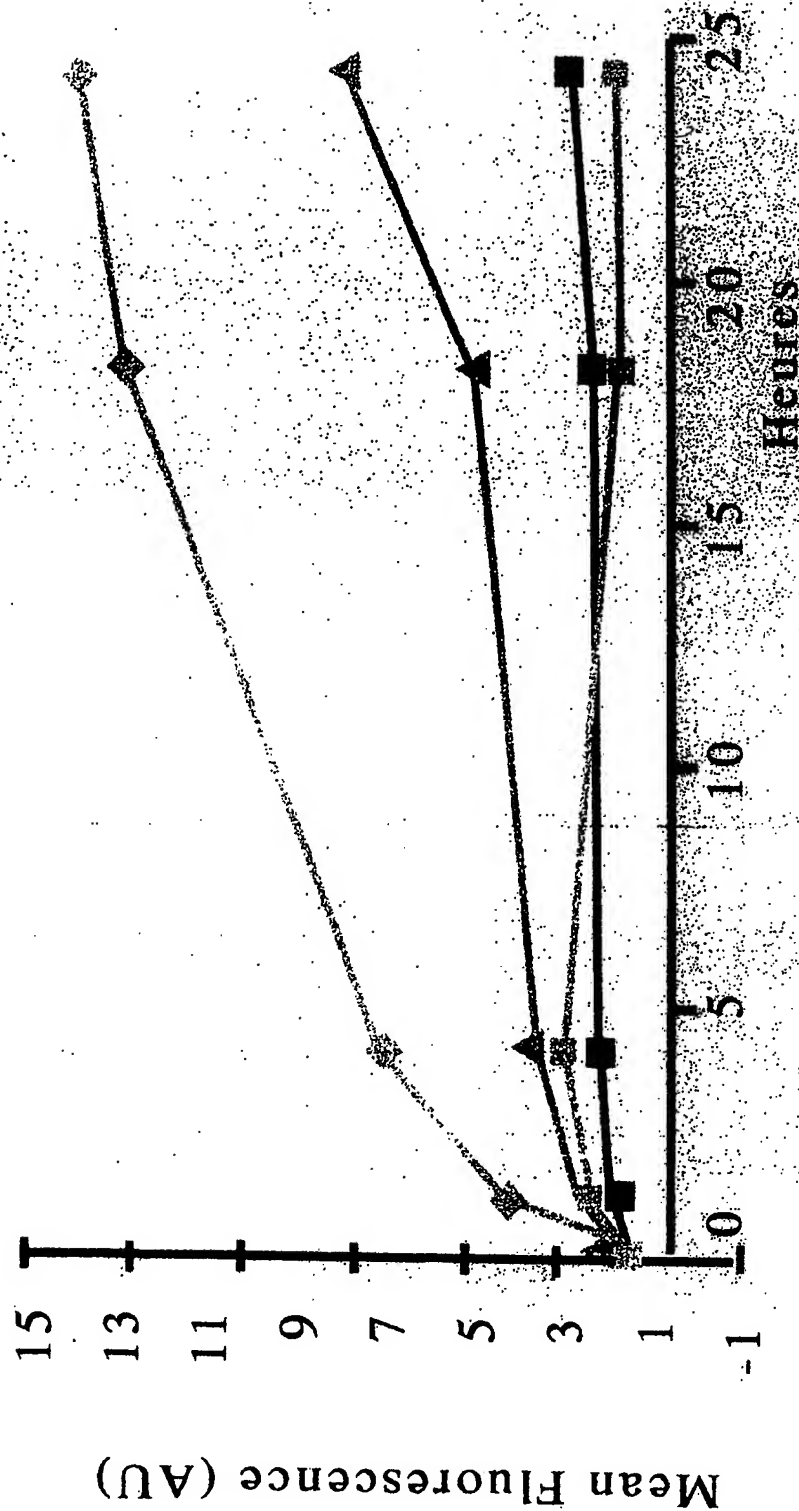
# Protection de l'ODN

Fig. 4



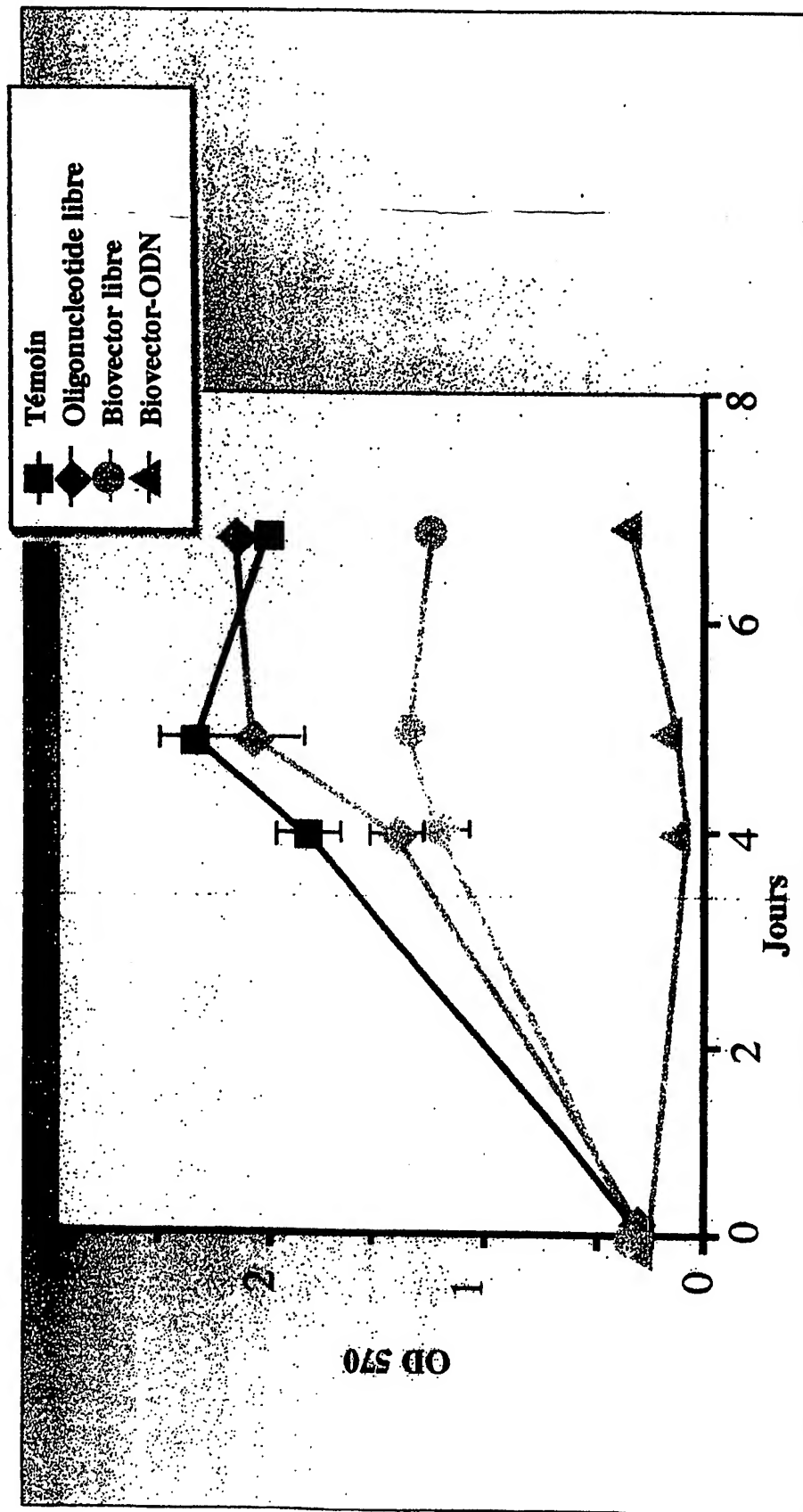
**ODN Cellular uptake**

Fig.5



# Comparaison ODN-Biovecteur et ODN libre

Fig. 6



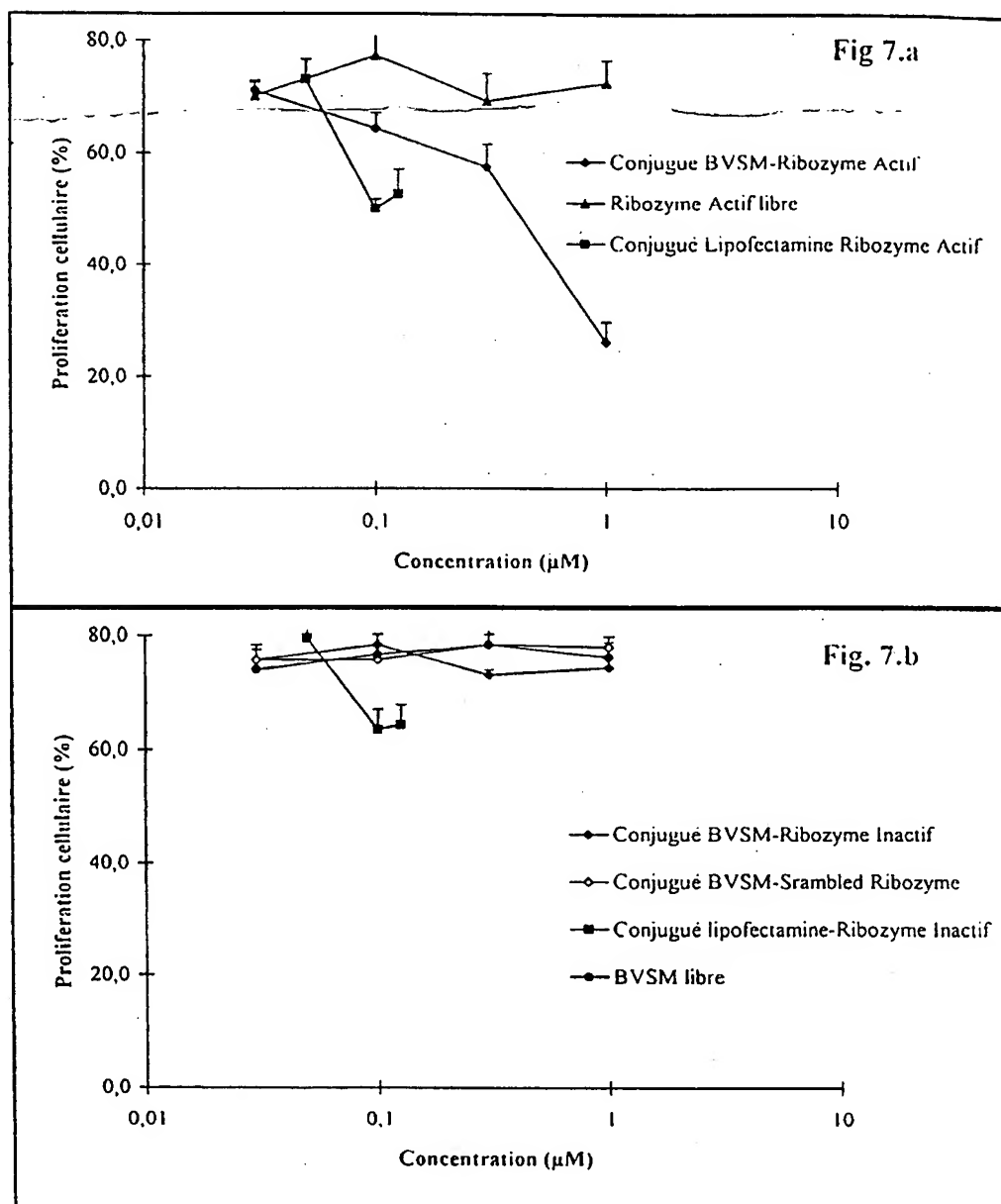
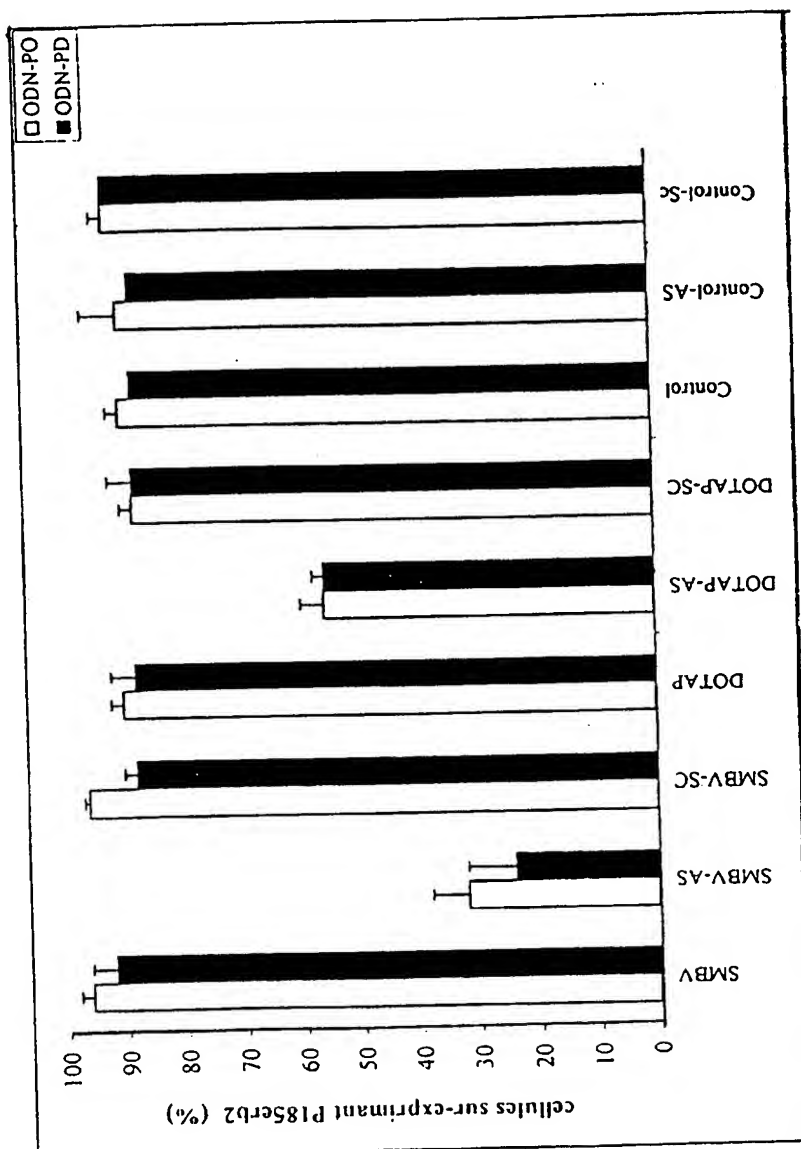
Activité cellulaire des conjugués Ribozyme Biovecteur



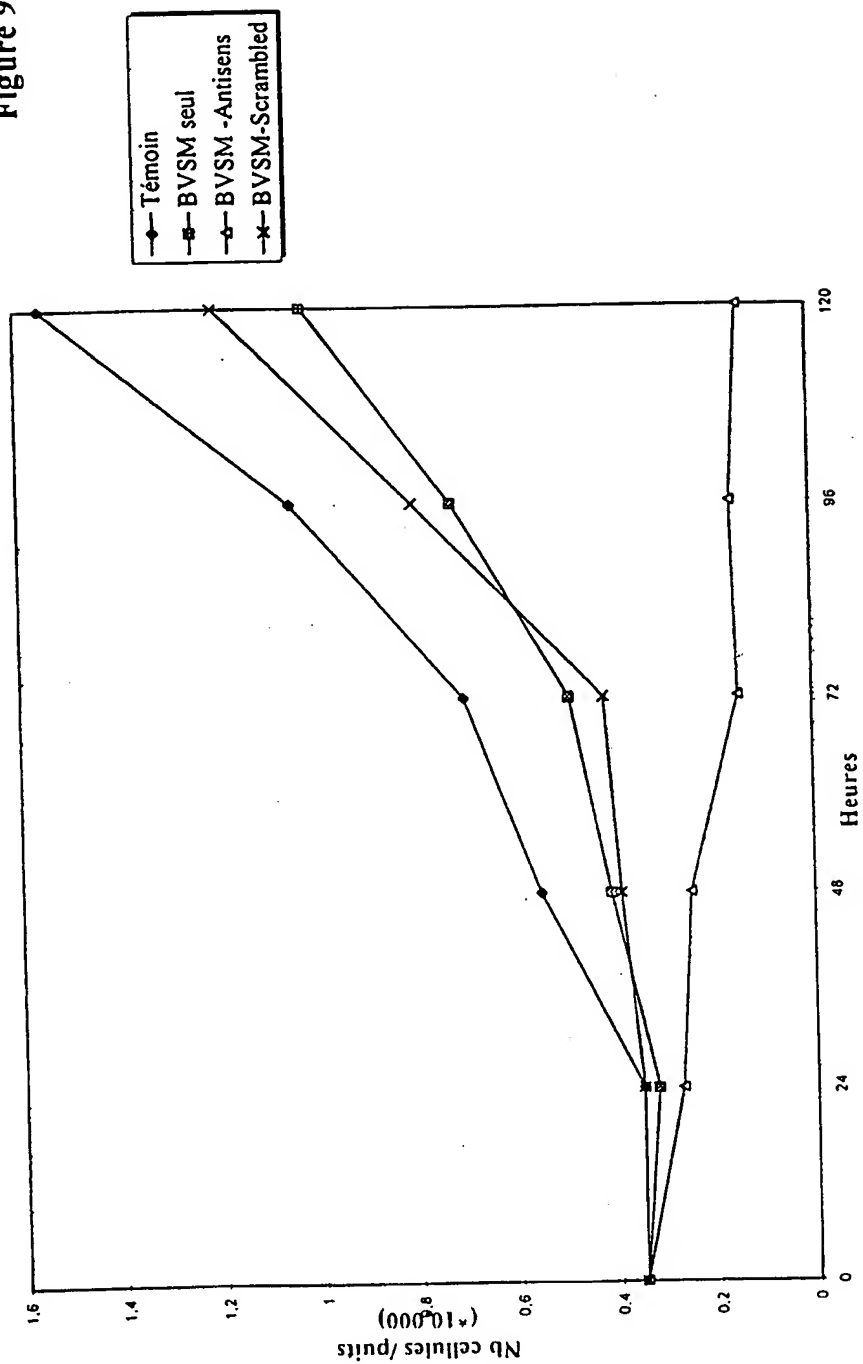
Figure 8

Effet de conjugué ODN-Biovecteur sur l'expression protéique



Activité cellulaire de conjugués ODN antisens-Biovecteur

Figure 9



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No

PCT/FR 97/02332

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/88 C12N15/10 A61K9/51 C12N15/11 C12N9/00  
A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X          | M. BERTON ET AL: "Delivery of oligonucleotides by synthetic low density lipoproteins : incorporation and stability studies"<br>PROCEEDINGS OF THE 21ST INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CONTROLLED RELEASE OF BIOACTIVE MATERIALS,<br>vol. 21, 27 - 30 June 1994, NICE , FRANCE,<br>pages 83-84, XP002042293<br>cited in the application | 1,24                  |
| A          | see the whole document<br>---<br>-/-   | 2-23,<br>25-30        |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 April 1998

Date of mailing of the international search report

23. 04. 1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Le Cornec, N

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter national Application No

PCT/FR 97/02332

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| Y          | <p>M. PEYROT: "Les biovecteurs supramoléculaires, une nouvelle génération de transporteurs de principes actifs"<br/>S.T.P. PHARMA PRATIQUES ,<br/>vol. 4, no. 5, June 1994,<br/>pages 344-346, XP002042294<br/>see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>  | 1-30                  |
| Y          | <p>WO 92 21329 A (A ET S BIOVECTORS) 10<br/>December 1992<br/>cited in the application<br/>see claims; examples 14,19-21</p> <p style="text-align: center;">---</p>   | 1-30                  |
| Y          | <p>MIGUEL DE I ET AL: "SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF SUPRAMOLECULAR BIOVECTOR(SMBV) SPECIFICALLY DESIGNED FOR THE ENTRAPMENT OF IONIC MOLECULES"<br/>BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA,<br/>vol. 1237, no. 1, 1995,<br/>pages 49-58, XP000601223<br/>*see the whole document in particular page 55 right hand column and page 57 left hand column*</p> <p style="text-align: center;">---</p> | 1-30                  |
| Y          | <p>WO 92 21330 A (A ET S BIOVECTEURS) 10<br/>December 1992<br/>cited in the application<br/>see page 8, line 21 - line 26; claims;<br/>example 6<br/>see page 3, line 20 - line 25</p> <p style="text-align: center;">---</p>   | 1-30                  |
| Y          | <p>A.R. THIERRY ET AL: "Liposomal Delivery as a new approach to transport antisense oligonucleotides"<br/>GENE REGULATION . BIOLOGY OF ANTISENSE RNA AND DNA ,<br/>vol. 1, 1992, ROBERT P. ERICKSON AND JONATHAN G. IZANT .RAVEN PRESS, NEW YORK, USA,<br/>pages 147-161, XP002040368<br/>*see the whole document in particular pages 149-150*</p> <p style="text-align: center;">---</p>     | 1-30                  |
| Y          | <p>WO 94 20078 A (A ET S BIOVECTEURS) 15<br/>September 1994<br/>cited in the application<br/>see claims; examples 2,5</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>  | 1-30                  |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter      nal Application No  
PCT/FR 97/02332

| C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |  |                       |
|--|--|-----------------------|
| Category *   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
| Y  | M. PEYROT ET AL: "Supramolecular biovectors (SMBV): a new family of nanoparticulate drug delivery systems. Synthesis and structural characterization" INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, vol. 102, 1994, pages 25-33, XP002042295<br>see page 31<br>see page 26; figure 1<br>---  | 1-30                  |
| Y  | C. CHAVANY ET AL: "Adsorption of oligonucleotides onto polyisohexylcyanoacrylate nanoparticles protects them against nucleases and increases their cellular uptake" PHARMACEUTICAL RESEARCH, vol. 11, no. 9, 1994, pages 1370-1378, XP002042296<br>cited in the application<br>see the whole document<br>---                     | 1-30                  |
| Y  | EP 0 344 040 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)) 29 November 1989<br>cited in the application<br>see page 5, line 46 - line 55; example 1<br>see page 5, line 5 - line 37<br>---   | 1-30                  |
| P,X  | M. BERTON ET AL: "Improved oligonucleotide uptake and stability by a new drug carrier, the SupraMolecular BioVector (SMBV)" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1355, 10 January 1997, pages 7-19, XP002042297<br>see the whole document<br>in particular page 9, page 11 right-hand paragraph and page 16 last paragraph<br>--- | 1-30                  |
| T  | S.P. VYAS ET AL: "Self-assembling supramolecular biovectors: a new dimension in novel drug delivery systems " PHARMAZIE, vol. 52, no. 4, April 1997, pages 259-267, XP002042298<br>-----   |                       |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 97/02332

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  
see supplementary sheet CONTINUATION OF INFORMATION PCT/ISA/210
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/FR 97/02332

Observation: Although claims 24-26 (insofar as an in vivo method is concerned) concern a method for the treatment of the human/animal body (PCT Rule 13.1(IV)), the search was carried out on the basis of the effects attributed to the product/composition.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No

PCT/FR 97/02332

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9221329 A                              | 10-12-92            | FR 2677249 A               | 11-12-92            |
|   |                     | AT 152619 T                | 15-05-97            |
|   |                     | CA 2088759 A               | 05-12-92            |
|   |                     | DE 69219561 D              | 12-06-97            |
|   |                     | DE 69219561 T              | 13-11-97            |
|   |                     | EP 0542969 A               | 26-05-93            |
|   |                     | JP 6500570 T               | 20-01-94            |
| -----                                     |                     |                            |                     |
| WO 9221330 A                              | 10-12-92            | FR 2677272 A               | 11-12-92            |
|   |                     | AT 145822 T                | 15-12-96            |
|   |                     | CA 2088910 A               | 06-12-92            |
|   |                     | DE 69215652 D              | 16-01-97            |
|   |                     | EP 0547191 A               | 23-06-93            |
|   |                     | JP 6500795 T               | 27-01-94            |
| -----                                     |                     |                            |                     |
| WO 9420078 A                              | 15-09-94            | FR 2702160 A               | 09-09-94            |
|   |                     | AT 158179 T                | 15-10-97            |
|   |                     | CA 2157384 A               | 15-09-94            |
|   |                     | DE 69405718 D              | 23-10-97            |
|   |                     | DE 69405718 T              | 19-03-98            |
|   |                     | EP 0687173 A               | 20-12-95            |
|   |                     | EP 0782851 A               | 09-07-97            |
|   |                     | EP 0787479 A               | 06-08-97            |
|   |                     | JP 8507765 T               | 20-08-96            |
| -----                                     |                     |                            |                     |
| EP 344040 A                               | 29-11-89            | FR 2631826 A               | 01-12-89            |
|   |                     | ES 2054048 T               | 01-08-94            |
|   |                     | WO 8911271 A               | 30-11-89            |
|   |                     | JP 4500662 T               | 06-02-92            |
|   |                     | US 5151264 A               | 29-09-92            |
| -----                                     |                     |                            |                     |



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem Internationale No  
PCT/FR 97/02332

| <b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b><br>CIB 6 C12N15/88 C12N15/10 A61K9/51 C12N15/11 C12N9/00<br>A61K47/48   |  |  |
|---|--|--|
| Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB   |  |  |
| <b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b><br>Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)<br>CIB 6 C12N A61K  |  |  |
| Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche   |  |  |
| Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)   |  |  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>   |  |  |
| Catégorie *   | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents   | no. des revendications visées  |
| X   | M. BERTON ET AL: "Delivery of oligonucleotides by synthetic low density lipoproteins : incorporation and stability studies"<br>PROCEEDINGS OF THE 21ST INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CONTROLLED RELEASE OF BIOACTIVE MATERIALS,<br>vol. 21, 27 - 30 juin 1994, NICE , FRANCE,<br>pages 83-84, XP002042293<br>cité dans la demande | 1,24   |
| A   | voir le document en entier<br>---<br>-/--  | 2-23,<br>25-30   |
| <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe   |  |  |
| * Catégories spéciales de documents cités:<br>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent<br>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date<br>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)<br>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens<br>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée<br>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention<br>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément<br>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier<br>"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets |  |  |
| Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée<br>9 avril 1998   |  | Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale<br>23. 04. 1998 |
| Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale<br>Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,<br>Fax: (+31-70) 340-3016   |  | Fonctionnaire autorisé<br>Le Cornec, N   |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No  
PCT/FR 97/02332

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS |  |                               |
|---|--|-------------------------------|
| Catégorie                                       | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents   | no. des revendications visées |
| Y   | M. PEYROT: "Les biovecteurs supramoléculaires, une nouvelle génération de transporteurs de principes actifs"<br>S.T.P. PHARMA PRATIQUES ,<br>vol. 4, no. 5, juin 1994,<br>pages 344-346, XP002042294<br>voir le document en entier<br>---  | 1-30                          |
| Y   | WO 92 21329 A (A ET S BIOVECTORS) 10<br>décembre 1992<br>cité dans la demande<br>voir revendications; exemples 14,19-21<br>---   | 1-30                          |
| Y   | MIGUEL DE I ET AL: "SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF SUPRAMOLECULAR BIOVECTOR(SMBV) SPECIFICALLY DESIGNED FOR THE ENTRAPMENT OF IONIC MOLECULES"<br>BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA,<br>vol. 1237, no. 1, 1995,<br>pages 49-58, XP000601223<br>* le document en entier plus<br>particulièrement page 55 colonne de droite et page 57 colonne de gauche *<br>--- | 1-30                          |
| Y   | WO 92 21330 A (A ET S BIOVECTEURS) 10<br>décembre 1992<br>cité dans la demande<br>voir page 8, ligne 21 - ligne 26;<br>revendications; exemple 6<br>voir page 3, ligne 20 - ligne 25<br>---  | 1-30                          |
| Y   | A.R. THIERRY ET AL: "Liposomal Delivery as a new approach to transport antisense oligonucleotides"<br>GENE REGULATION . BIOLOGY OF ANTISENSE RNA AND DNA ,<br>vol. 1, 1992, ROBERT P. ERICKSON AND JONATHAN G. IZANT .RAVEN PRESS, NEW YORK, USA,<br>pages 147-161, XP002040368<br>* le document en entier plus<br>particulièrement page 149-150 *<br>---      | 1-30                          |
| Y   | WO 94 20078 A (A ET S BIOVECTEURS) 15<br>septembre 1994<br>cité dans la demande<br>voir revendications; exemples 2,5<br>---  | 1-30                          |
|   | ---  |                               |
|   | -/--   |                               |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Denu Internationale No  
PCT/FR 97/02332

| C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS |   |                               |
|---|---|-------------------------------|
| Catégorie                                       | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents  | no. des revendications visées |
| Y   | M. PEYROT ET AL: "Supramolecular biovectors (SMBV): a new family of nanoparticulate drug delivery systems. Synthesis and structural characterization" INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS, vol. 102, 1994, pages 25-33, XP002042295<br>voir page 31<br>voir page 26; figure 1  | 1-30                          |
| Y   | ---<br>C. CHAVANY ET AL: "Adsorption of oligonucleotides onto polyisohexylcyanoacrylate nanoparticles protects them against nucleases and increases their cellular uptake" PHARMACEUTICAL RESEARCH, vol. 11, no. 9, 1994, pages 1370-1378, XP002042296<br>cité dans la demande<br>voir le document en entier                                    | 1-30                          |
| Y   | ---<br>EP 0 344 040 A (CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)) 29 novembre 1989<br>cité dans la demande<br>voir page 5, ligne 46 - ligne 55; exemple 1<br>voir page 5, ligne 5 - ligne 37  | 1-30                          |
| P,X   | ---<br>M. BERTON ET AL: "Improved oligonucleotide uptake and stability by a new drug carrier, the SupraMolecular BioVector (SMBV)" BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1355, 10 janvier 1997, pages 7-19, XP002042297<br>voir le document en entier plus particulièrement page 9, page 11<br>paragraphe de droite et page 16 dernier paragraphe | 1-30                          |
| T   | ---<br>S.P. VYAS ET AL: "Self-assembling supramolecular biovectors: a new dimension in novel drug delivery systems " PHARMAZIE, vol. 52, no. 4, avril 1997, pages 259-267, XP002042298<br>-----   |                               |

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°  
PCT/FR 97/02332

## Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☒ Les revendications n°s  
se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:  
voir feuille supplémentaire SUITE DES RENSEIGNEMENTS PCT/ISA/210
2. ☐ Les revendications n°s  
se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n°s  
sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 5.4.a).

## Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°s
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°s

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

Remarque : Bien que les revendications 24-26 (pour autant que cela concerne une méthode in vivo) concernent une méthode de traitement du corps humain/animal (règle 13.1(IV) PCT), la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit/à la composition.

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem internationale No

PCT/FR 97/02332

| Document brevet cité<br>au rapport de recherche | Date de<br>publication | Membre(s) de la<br>famille de brevet(s)   | Date de<br>publication   |
|---|------------------------|---|--|
| WO 9221329 A                                    | 10-12-92               | FR 2677249 A<br>AT 152619 T<br>CA 2088759 A<br>DE 69219561 D<br>DE 69219561 T<br>EP 0542969 A<br>JP 6500570 T                                 | 11-12-92<br>15-05-97<br>05-12-92<br>12-06-97<br>13-11-97<br>26-05-93<br>20-01-94                         |
| WO 9221330 A                                    | 10-12-92               | FR 2677272 A<br>AT 145822 T<br>CA 2088910 A<br>DE 69215652 D<br>EP 0547191 A<br>JP 6500795 T  | 11-12-92<br>15-12-96<br>06-12-92<br>16-01-97<br>23-06-93<br>27-01-94                                     |
| WO 9420078 A                                    | 15-09-94               | FR 2702160 A<br>AT 158179 T<br>CA 2157384 A<br>DE 69405718 D<br>DE 69405718 T<br>EP 0687173 A<br>EP 0782851 A<br>EP 0787479 A<br>JP 8507765 T | 09-09-94<br>15-10-97<br>15-09-94<br>23-10-97<br>19-03-98<br>20-12-95<br>09-07-97<br>06-08-97<br>20-08-96 |
| EP 344040 A                                     | 29-11-89               | FR 2631826 A<br>ES 2054048 T<br>WO 8911271 A<br>JP 4500662 T<br>US 5151264 A  | 01-12-89<br>01-08-94<br>30-11-89<br>06-02-92<br>29-09-92   |